

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III



TESIS DOCTORAL

**La familia de las metalotioneínas en *Tetrahymena*
y
su aplicación en el desarrollo de biosensores
celulares para la detección de metales pesados**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Francisco Amaro Torres

Bajo la dirección del doctor:

Juan Carlos Gutiérrez Fernández

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-3197-2

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Microbiología III



La familia de las metalotioneínas en *Tetrahymena* y su aplicación en el desarrollo de biosensores celulares para la detección de metales pesados

Memoria que para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas presenta
Don Francisco Amaro Torres

Vº Bº del Director

El Doctorando

Dr. Juan Carlos Gutiérrez Fernández

Franciso Amaro Torres

Madrid, 2009

A mis padres.
A la memoria de *la* *yaya*.

Agradecimientos

Al Dr. Juan Carlos Gutiérrez, director de esta Tesis Doctoral, por su ayuda en la realización de este trabajo de investigación durante estos años. Me gustaría agradecerle también junto a la Dra. Ana Martín, su confianza y la oportunidad que ambos me dieron de incorporarme a su grupo de investigación.

A la Dra. Covadonga Vázquez, directora del Departamento de Microbiología III de la UCM, por permitirme realizar mis estudios de doctorado en este departamento.

A la Comisión de Doctorado del Departamento de Microbiología III, y a las Evaluadoras Externa e Interna. Gracias por facilitar el proceso de trámite administrativo de esta tesis.

Al Dr. Aaron Turkewitz (*Department of Molecular Genetics and Cell Biology. The University of Chicago. Chicago, USA*), por acogerme tan generosamente en su laboratorio durante mi estancia predoctoral, y ayudarme a obtener las cepas transformantes de *T. thermophila*. Gracias por haberme enseñado tanto en tan poco tiempo, por tu paciencia y ayuda en todo momento, *grazie per essere stato anche un amico*. Gracias porque junto a Anna (Dra. Anna di Rienzo, *Department of Human Genetics and Cell Biology, The University of Chicago*) me hicisteis sentir en Chicago como en casa, gracias por las cenas, por vuestra inolvidable amabilidad y hospitalidad. Gracias también a todos los miembros del laboratorio de Aaron por su calurosa acogida, especialmente a Nhi Khuong y Nicky Kambesis, de quienes tanto aprendí. Gracias también a todos los que en la Universidad de Chicago me hicieron sentir uno más.

Al Dr. Daniel Romero (*Department of Pharmacology, Medical School, University of Minnesota. Minneapolis, USA*) y al Dr. Jack Gaertig (*Department of Cell Biology, University of Georgia. Athens, USA*), por regalarnos amablemente el plásmido pBt Δ Luc y la cepa CU522 de *T. thermophila* respectivamente.

Al Dr. Eduardo Orias y a la Dra. Eileen Hamilton (*Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology. University of California. Santa Barbara, USA*), por su colaboración en el análisis *in silico* del gen *MTT5* de *T. thermophila*.

Al Dr. Simone Ottonello y a la Dra. Roberta Ruotolo (*Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare. Università di Parma. Parma. Italia*); y a la Dra. Andrea Faccini (*Dipartimento di Chimica Organica e Industriale. Università di Parma*), por su colaboración en el análisis por HPLC-MS de la existencia de fitoquelatinas en *T. thermophila*. Gracias también al Dr. Enrique Torres (*Departamento de Biología Celular e Molecular. Universidade Da Coruña. A Coruña*), por su colaboración en los análisis mediante electroforesis capilar.

A la Dra. Goya Carbonell (Departamento de Medio Ambiente. INIA. Madrid), por proporcionarnos las muestras de suelo contaminadas con metales pesados identificados y cuantificados. Al Dr. Enrique Peñalver (Instituto Geominero de España. Madrid), por suministrarnos las muestras de suelo procedentes de Nueva Zelanda. Y a la Dra. Ingrid Walter (Departamento de Medio Ambiente. INIA. Madrid), por proporcionarnos las muestras de suelo de Aznalcóllar contaminadas. Gracias por todas las muestras, tan útiles para la validación de los biosensores celulares.

A todos los investigadores que con sus e-mails amablemente respondieron a mis preguntas.

Al personal de la Unidad de Genómica de la UCM, por su amabilidad y disposición.

Gracias a todos los miembros del departamento, por hacer que recuerde estos años de trabajo con un profundo cariño. Gracias a los profesores que se han interesado en la evolución de este trabajo. Gracias Esther, Carmen y Juan Luis, por vuestro apoyo, ayuda y simpatía. Gracias a l@s compañer@s de los otros laboratorios (Mónica, Javi, Eva, Ale, Miriam, Amaia, Belén, Jessica, Noelia, Petra, Antonio y Eva), por vuestro apoyo, por las risas en la comida, por hacer que los congresos sean más divertidos... Mónica, gracias por los consejos a mis preguntas. Gracias a la Dra. Laura Benítez, Eva, Javi y Mónica por su simpatía en mis continuas visitas al lector de microplacas.

A Silvia, Manu, Virginia, Pili, Andrea, Mapi, Ruth, Sara, Edu, Carlos y Raquel; por hacer que cada día en el departamento haya sido un auténtico placer. Gracias por vuestro tiempo, por bailar el pH, por vuestros consejos y vuestro apoyo, por Almería, por hacerme reír, por hacerme llorar, por el día del helado gratis, por ser mis amigos, por todas las veces que me habéis escuchado (me escucháis), por el parto, gracias por cuidarme tanto. Sara, gracias por tu sonrisa. Manu, gracias por ser un buen amigo. Silvia, Virginia, Pili, Andrea, Mapi y Ruth, gracias por el universo paralelo del 12-11, porque esta tesis es de todos. Gracias por todo lo que hay en las fotos que tenemos. Gracias Ruth, por todo lo que me has enseñado, personal y profesional; gracias por la T, por la V y por la B.

A Mar y Lola, por todo lo que me animáis, por vuestra confianza, por ser tan positivas.

A Félix, Jorge, Jesús, Viky, Natalia, Ángela, Jose, Bea, Laura, Alberto y Gonzalo, a mis Tutores, a Nati, y especialmente a mis compis de piso Ana, Dani y Elo; por aguantarme durante la tesis, por animarme a continuar, por escucharme, por todo lo que nos reimos juntos, por ayudarme a desconectar, gracias por cantarme la canción de Astrud. Y a Unai, Olivia, Chari, Amanda, Alema, Jose y Raquel, gracias por los años en esta facultad, por vuestra amistad, y por vuestro apoyo durante la realización de esta tesis.

A mi familia, a mis padres Damián y Mari, a mi abuelo Paco, a mis hermanos Angel y Carlos, y a M. Mar. A mi abuela. A todos vosotros gracias por ser un apoyo imprescindible durante este tiempo, por escuchar mis alegrías y mis frustraciones, mi enfados con la ciencia y con los genes, mis ilusiones e incertidumbre sobre el futuro del investigador. Gracias mamá por tantas y tantas conversaciones en la cena, en el teléfono, por tus mails en Chicago... gracias por escucharme, gracias por quererme tanto.

A Alberto, por confiar en mí, por tu apoyo, por estar ahí todos los días, por entender mi falta de tiempo, por la habitación del rollo, por encontrar tu sonrisa entre tantos *papers*, por hacer de los días vacaciones.

La realización de esta tesis ha sido posible gracias a la obtención de una Beca Predoctoral FPI concedida por la Universidad Complutense de Madrid, así como una Beca para Estancias Breves del programa FPI, concedida también por la UCM, que posibilitó mi estancia predoctoral en el laboratorio del profesor Dr. Aaron Turkewitz de la Universidad de Chicago.

Además, este trabajo ha sido financiado por los siguientes proyectos: "Respuesta a estrés frente a contaminantes ambientales en el protozoo ciliado modelo *Tetrahymena thermophila*: Metalotioneínas, estrés oxidativo, biosensores celulares" (CGL2005-00548/BOSMEC, financiado por el MEC); "Biosensores celulares microbianos para la detección de metales pesados" (CCG07-UCM/BIO-2508, financiado por CAM-UCM); y "El ciliado modelo *Tetrahymena thermophila* como herramienta celular para el estudio de las interacciones "metal pesado-célula eucariota": elementos involucrados en la expresión de genes de metalotioneínas, validación de biosensores celulares, metabolismo del glutatión, muerte celular programada (apoptosis-autofagia)" (AGL2008-00317/BOS, financiado por el MCI).

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Microbiología III



**La familia de las metalotioneínas en *Tetrahymena* y
su aplicación en el desarrollo de biosensores
celulares para la detección de metales pesados**

TESIS DOCTORAL

FRANCISCO AMARO TORRES

Madrid, 2009

Abreviaturas	5
Introducción	9
A. METALES: TOXICIDAD Y MECANISMOS DE RESISTENCIA	9
A.1 Concepto de metal pesado	9
A.2 Aspectos fundamentales sobre metales	9
A.3 Mecanismos de toxicidad de metales	11
A.4 Mecanismos de detoxificación de metales	12
A.5 Mecanismos de detoxificación de metales en ciliados	13
A.5.1 Bioacumulación en ciliados	14
B. MOLÉCULAS QUELADORAS DE METALES PESADOS	15
B.1 Metalotioneínas	15
B.1.1 Concepto y funciones biológicas	15
B.1.2 Clasificación y estructura	16
B.1.3 Regulación de la biosíntesis de metalotioneínas	19
B.1.4 Metalotioneínas en ciliados	21
B.2 Fitoquelatinas	22
B.2.1 Fitoquelatinas y fitoquelatín sintasa	22
B.2.2 Mecanismo catalítico de síntesis de fitoquelatinas	22
B.2.3 Función biológica de la enzima fitoquelatín sintasa	23
B.2.4 Mecanismo de detoxificación de metales por fitoquelatinas	26
C. DETECCIÓN Y SEGUIMIENTO DE METALES EN EL MEDIO AMBIENTE. BIOSENSORES	27
C.1 Contaminación por metales, un grave problema ambiental	27
C.2 Detección y evaluación de metales en el medio ambiente	27
C.3 Biosensores moleculares y celulares para metales	28
C.4 Tipos de bioensayos empleando biosensores celulares	30
C.5 Ventajas del uso de microorganismos como biosensores celulares para la evaluación de la contaminación ambiental	32
C.6 Ventajas del protozoo ciliado <i>Tetrahymena thermophila</i> como biosensor celular	32
Objetivos	35
Materiales y Métodos	37
MATERIALES	37
1 MATERIAL BIOLÓGICO	37
1.1 Especies del protozoo ciliado <i>Tetrahymena</i>	37
1.1.1 <i>T. thermophila</i> Nanney and McCoy	37
1.1.2 <i>T. rostrata</i> (Kahl) Corliss	37
1.2 <i>Escherichia coli</i>	38
1.3 Mantenimiento de cepas	38
1.3.1 Mantenimiento y conservación de cepas de <i>E. coli</i>	38
1.3.2 Mantenimiento y conservación de cepas de <i>Tetrahymena</i>	38
2 MEDIOS DE CULTIVO	39
3 SOLUCIONES Y TAMPONES	39
MÉTODOS	42
4 TRATAMIENTOS CON AGENTES ESTRESANTES	42
5 AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS	44
5.1 Aislamiento de ADN total	44
5.2 Aislamiento de ARN total	45
5.3 Aislamiento de ADN plasmídico (<i>miniprep</i>)	45
5.4 Extracción de bandas de ADN de geles de agarosa	46

6 AMPLIFICACIÓN GÉNICA POR PCR	46
6.1 Cebadores utilizados	46
6.2 PCR estándar	46
6.3 RT-PCR	49
6.4 RACE (<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>)	49
6.5 RT-PCR cuantitativa o a tiempo real	49
7 MÉTODOS ELECTROFORÉTICOS	51
7.1 Electroforesis de ADN en geles de agarosa	51
7.2 Electroforesis de ARN en geles desnaturalizantes de agarosa	52
7.3 Electroforesis de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)	52
7.3.1 Tinción de geles de proteína con plata compatible con espectrometría de masas	52
7.4 Electroforesis capilar	53
8 CLONACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN	53
8.1 Digestión de ADN con endonucleasas de restricción	53
8.2 Plásmidos utilizados	54
8.3 Inserción del fragmento de ADN en el plásmido	54
8.3.1 Reacción de ligación con el plásmido <i>pCR[®]2.1 TOPO</i>	54
8.3.2 Reacción de ligación con los plásmidos <i>pVGF.MTT</i> y <i>pBtΔ(-7)Luc</i>	54
8.4. Transformación de <i>E. coli</i> y selección de clones positivos	55
9 SECUENCIACIÓN DE ADN	56
10 TRANSFORMACIÓN DE <i>T. thermophila</i>	56
10.1 Transformación por electroporación de células conjugantes de <i>T. thermophila</i>	56
10.2 Transformación biolística del macronúcleo de <i>T. thermophila</i> cepa CU522	57
10.3 Aislamiento de clones y establecimiento de líneas clonales recombinantes de <i>T. thermophila</i>	58
11 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ADN-PROTEÍNA	58
11.1 Preparación de extractos nucleares	58
11.2 Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)	59
11.3 <i>Southwestern blot</i>	60
11.4 Purificación parcial de proteínas de unión a ADN	61
12 TÉCNICAS MICROSCÓPICAS	62
12.1 Microscopía de fluorescencia	62
12.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	62
13 CITOMETRÍA DE FLUJO	63
14 ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA LUCIFERASA	63
14.1 Cuantificación de actividad luciferasa <i>in vitro</i> a partir de extractos celulares	64
14.2 Cuantificación de actividad luciferasa <i>in vivo</i> a partir de células permeabilizadas al sustrato D-luciferina	65
14.3 Cuantificación de actividad luciferasa <i>in vivo</i> a partir de células sin permeabilizar	65
15 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)	65
16 PROGRAMAS INFORMÁTICOS EMPLEADOS	66
16.1 Búsqueda de similitud de secuencias. Alineamiento múltiple de secuencias y construcción de árboles filogenéticos	66
16.2 Búsqueda de motivos, patrones o dominios conservados en secuencias nucleotídicas o aminoácidas	67
16.3 Búsqueda de ESTs en TDB, PDB y UNIGENE	67
16.4 Análisis de estructura primaria y predicción de estructuras 2D y 3D de ácidos nucleicos y proteínas	67
16.5 Diseño de cebadores y otras secuencias de oligonucleótidos	68
16.6 Análisis estadístico	68
Resultados	71
A. CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE METALOTIONEÍNAS EN <i>Tetrahymena</i>	71
A.1 Aislamiento y caracterización estructural de nuevos genes codificantes para metalotioneínas (MTs) en <i>Tetrahymena</i> : <i>TtheMTT5</i> , <i>TrosMTT1</i> y <i>TrosMTT2</i>	71
A.1.1 Aislamiento y caracterización estructural del gen <i>MTT5</i> de <i>T. thermophila</i> (<i>TtheMTT5</i>)	71

A.1.2 Aislamiento y caracterización estructural de los genes <i>MTT1</i> y <i>MTT2</i> de <i>T. rostrata</i>	72
A.2 Caracterización estructural de las proteínas inferidas de los genes <i>TtheMTT5</i> , <i>TrosMTT1</i> y <i>TrosMTT2</i>	73
A.3 Alineamiento múltiple y análisis filogenético de secuencias de MTs de <i>Tetrahymena</i>	74
A.3.1 Clasificación de las metalotioneínas del género <i>Tetrahymena</i> en dos subfamilias: subfamilia 7a (Cd-MTs) y subfamilia 7b (Cu-MTs)	74
A.3.2 Estructura modular de las MTs de <i>Tetrahymena</i>	77
A.4 Análisis de la expresión de genes de MTs de <i>Tetrahymena</i> bajo diferentes situaciones de estrés	78
A.4.1 Análisis comparativo de la expresión de los genes <i>MTT1</i> , <i>MTT3</i> y <i>MTT5</i> de <i>T. thermophila</i> (<i>TtheMTT1</i> , <i>TtheMTT3</i> y <i>TtheMTT5</i>)	78
A.4.2 Análisis comparativo de la expresión de los genes <i>MTT1</i> y <i>MTT2</i> de <i>T. rostrata</i>	80
A.5 Estudio de la región promotora del gen <i>MTT5</i> de <i>T. thermophila</i>	81
A.5.1 Análisis <i>in silico</i> de las regiones 5' y 3' UTR del gen <i>TtheMTT5</i>	81
A.5.2 Búsqueda de proteínas implicadas en la regulación del promotor del gen <i>TtheMTT5</i>	83
A.5.2.1 Búsqueda y caracterización estructural de genes de la superfamilia bZIP en el genoma macronuclear de <i>T. thermophila</i>	83
A.5.2.2 Análisis de la expresión de tres de los genes bZIP (<i>TthebZIP1</i> , <i>TthebZIP2</i> y <i>TthebZIP3</i>) de <i>T. thermophila</i>	88
A.5.2.3 Estudio de la interacción del motivo MTCM1 con proteínas presentes en extractos nucleares de <i>T. thermophila</i>	88
A.5.2.4 Separación electroforética de proteínas que interaccionan con el dominio MTCM1	91
A.6 Localización subcelular de las proteínas <i>MTT1</i> y <i>MTT5</i> de <i>T. thermophila</i> : Estudio <i>in vivo</i> y ultraestructural de cepas transformadas (que sobreexpresan MTs) y cepas control (fenotipo salvaje) bajo el estrés causado por Cd	92
B. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN <i>TtΨPCS</i> CODIFICANTE PARA UNA PSEUDOFITOQUELATÍN SINTASA EN <i>T. thermophila</i>	96
B.1 Aislamiento y caracterización estructural del gen <i>TtΨPCS</i> de <i>T. thermophila</i>	96
B.2 Análisis de la secuencia aminoacídica de <i>TtΨPCS</i> . Análisis comparativo y filogenético de <i>TtΨPCS</i> con otras secuencias FQS	98
B.3 Análisis de la expresión del gen <i>TtΨPCS</i> bajo estrés por metales pesados	104
B.4 Análisis de la presencia de fitoquelatinas en <i>T. thermophila</i>	104
C. BIOSENSORES CELULARES DE METALES PESADOS BASADOS EN LA UTILIZACIÓN DE PROMOTORES DE GENES DE METALOTIONEÍNAS DE <i>T. thermophila</i>	107
C.1 Biosensores basados en fluorescencia	107
C.1.1 Construcciones de biosensores celulares basados en las proteínas de fusión GFP:: <i>MTT5</i> o GFP:: <i>MTT1</i>	107
C.1.1.1 Construcciones reporteras pVGF.MTT1 y pVGF.MTT5	107
C.1.2 Respuesta del biosensor celular GFPMTT1 o GFPMTT5 al Cd	108
C.1.2.1 Bioensayo <i>turn on</i>	108
C.1.2.2 Análisis de la respuesta de la cepa GFPMTT5 como biosensor frente a Cd tras 2 horas de exposición	110
C.1.2.3 Análisis de la respuesta de la cepa GFPMTT5 como biosensor frente a Cd tras 24 h de exposición	110
C.1.2.4 Análisis cuantitativo de la expresión de la construcción <i>GFP::<i>MTT5</i></i> en respuesta a diferentes metales pesados	112
C.2 Biosensores basados en bioluminiscencia	114
C.2.1 Construcción de biosensores celulares basados en bioluminiscencia	114
C.2.1.1 Construcciones reporteras <i>P_{MTT1}::lucFF</i> y <i>P_{MTT5}::lucFF</i>	114
C.2.1.2 Cepas recombinantes MTT1Luc y MTT5Luc	114
C.2.2 Caracterización de la respuesta de las cepas MTT1Luc y MTT5Luc como biosensores celulares	118
C.2.2.1 Elaboración de un bioensayo de tipo <i>turn on</i> para la utilización de estas cepas como biosensores	118
C.2.2.1.1 Optimización de las condiciones del bioensayo	118
C.2.2.1.2 Cuantificación de la actividad luciferasa <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	118
C.2.2.2 Respuesta de los biosensores a distintos agentes inductores de estrés celular	120
C.2.2.2.1 Metales pesados	121
C.2.2.2.2 Mezclas de metales	122
C.2.2.2.3 Biodisponibilidad de los metales	124
C.2.2.2.4 Otros agentes de estrés celular	124
C.2.2.2.5 Análisis de la expresión de las construcciones <i>P_{MTT1}::lucFF</i> y <i>P_{MTT5}::lucFF</i> mediante RT-PCRq	125
C.2.2.2.5.1 Análisis de la expresión del gen reportero <i>lucFF</i> en las cepas MTT1Luc y MTT5Luc	125
C.2.2.2.5.2 Análisis de los niveles de expresión de los genes <i>TtheMTT1</i> y <i>TtheMTT5</i> en las cepas SB1969, MTT1Luc y MTT5Luc	126
C.2.3 Validación de los biosensores MTT1Luc y MTT5Luc	127
C.2.3.1 Muestras naturales contaminadas artificialmente por Cd	127
C.2.3.2 Muestras naturales (con metales pesados de concentración conocida, desconocida o presumiblemente no contaminadas)	129

Discusión	133
A. LA FAMILIA DE METALOTIONEÍNAS EN <i>Tetrahymena</i>	133
A.1 Genes de metalotioneínas en <i>Tetrahymena</i> : mayor longitud y ausencia de intrones respecto a otros genes de metalotioneínas	133
A.2 Las MTs de <i>Tetrahymena</i> se agrupan en dos subfamilias distintas: 7a (Cd-MTs) y 7b (Cu-MTs)	134
A.3 Análisis comparativo de la estructura primaria de las MTs de <i>Tetrahymena</i>	137
A.4 Distribución de los residuos de Cys: Las Cd-MTs de <i>Tetrahymena</i> presentan motivos CCC típicos	138
A.5 Capacidad queladora teórica de las MTs de <i>Tetrahymena</i>	138
A.6 Las MTs de la subfamilia 7a (Cd-MTs) comparten una estructura modular	141
A.7 Historia evolutiva de las MTs de <i>Tetrahymena</i>	142
A.8 Análisis de la expresión de los genes MTs de <i>Tetrahymena</i>	146
A.8.1 Carácter multiestrés de las MTs de <i>Tetrahymena</i>	147
A.8.2 Relevancia biológica de las MTs de <i>Tetrahymena</i> . Diferentes funciones para las distintas isoformas de MTs, y participación en mecanismos de protección cruzada frente a diversas condiciones de estrés (<i>cross-protection</i>)	152
A.9 Análisis de la región promotora de <i>TtheMTT5</i> . El motivo MTCM1 interacciona con varias proteínas de <i>T. thermophila</i> , posiblemente factores de transcripción de tipo bZIP	154
A.10 Procesamiento alternativo del transcrito <i>TtheMTT5</i> . Potencial significado regulador	161
A.11 Localización subcelular de las proteínas MTT1 y MTT5 de <i>T. thermophila</i> : Estudio <i>in vivo</i> y ultraestructural de cepas que sobreexpresan MTs y cepas control bajo el estrés causado por Cd	163
B. ESTUDIO DE LA PSEUDOFITOQUELATÍN SINTASA DE <i>Tetrahymena thermophila</i>	164
B.1 El gen <i>TtΨPCS</i> codifica para una putativa pseudofitoquelatín sintasa en <i>T. thermophila</i> , cuya expresión se induce únicamente en respuesta a Cd	164
B.2 La enzima <i>TtΨPCS</i> parece estar implicada en el catabolismo del GSH en lugar de la biosíntesis de fitoquelatinas	167
C. <i>Tetrahymena</i> COMO BIOSENSOR CELULAR DE METALES PESADOS	170
C.1 Los promotores de <i>TtheMTT1</i> y <i>TtheMTT5</i> como herramientas moleculares para la construcción de biosensores celulares de metales pesados	170
C.2 Ventajas de los biosensores MTT1Luc y MTT5Luc sobre el biosensor GFPMTT5	171
C.3 Caracterización de la respuesta de los biosensores MTT1Luc y MTT5Luc	173
C.3.1 Optimización de las condiciones del bioensayo <i>turn on</i>	173
C.3.2 La expresión de luciferasa en los biosensores MTT1Luc y MTT5Luc se puede cuantificar <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	174
C.3.3 Los biosensores MTT1Luc y MTT5Luc responden exclusivamente a la presencia de distintos metales pesados. Cada cepa presenta un perfil de respuesta diferente	176
C.3.4 La expresión de luciferasa en los biosensores MTT1Luc y MTT5Luc coincide con la expresión de los genes macronucleares <i>TtheMTT1</i> y <i>TtheMTT5</i> respectivamente en la cepa salvaje SB1969	178
C.3.5 La expresión basal de la construcción reportera puede utilizarse para identificar resultados falsos negativos	180
C.3.6 Variabilidad de la respuesta	182
C.3.7 Especificidad y sensibilidad de la respuesta de los biosensores. Las cepas MTT1Luc y MTT5Luc son capaces de detectar diferentes metales pesados en concentraciones del orden de nanomolar	183
C.4 Análisis comparativo de los biosensores MTT1Luc y MTT5Luc frente a otros biosensores eucariotas	188
C.5 Los biosensores MTT1Luc y MTT5Luc son capaces de detectar la presencia de metales pesados en forma biodisponible en muestras naturales	189
C.6 Los biosensores celulares como sistemas complementarios a la metodología tradicional de evaluación de la contaminación ambiental por metales	194
C.7 Validación de las cepas MTT1Luc y MTT5Luc como biosensores celulares para la detección de metales. Etapas concluidas y aspectos por mejorar	195
Conclusiones	199
Bibliografía	203
Anexo 1. Tablas complementarias	231
Anexo 2. Artículos publicados	235
Anexo 3. Patentes	280

Abreviaturas

3' UTR: región 3' no traducida (3' *UnTranslated Region*)
 5' UTR: región 5' no traducida (5' *UnTranslated Region*)
 aa: aminoácido
 AC: adenilato ciclasa
 ADN: ácido dextrirribonucleico
 ADNc: ADN complementario
 ADNg: ADN genómico
 AMPc: adenosín monofosfato cíclico
 AMPK: proteínaquinasa activada por AMP (*AMP-Activated Protein Kinase*)
 Anm1: módulo ancestral de tipo 1
 Anm2: módulo ancestral de tipo 2
 AP-1: factor de transcripción AP-1 (*Activator protein 1*)
 ARE: elemento de respuesta antioxidantes (*Antioxidants Response Element*)
 ARN: ácido ribonucleico
 ARNm: ARN mensajero
 bZIP: cremallera de leucina con una región básica (*Basic Leucine Zipper*)
 CCLR: *Cell Culture Lysis Reagent*
 CEE: Comunidad Económica Europea
 CγL: enzima cistationa liasa
 CSPD: 3-(4-metoxispiro-[1,2-dioxetano-3-, 2'(5'cloro)- triciclo[3.3.1.^{1,3,7}]decano]-4-il) fenil fosfato
 Ct: ciclo *threshold*
 C-terminal: carboxilo terminal
 D: Discusión
 dATP: nucleótido 2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato
 dCTP: nucleótido 2'-deoxicitidina 5'-trifosfato
 DEPC: dietil pirocarbonato
 dGTP: nucleótido 2'-deoxiguanosina 5'-trifosfato
 DIG: digoxigenina
 dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato
 DPTA: ácido diaetilenetriaminopentaacético
 DTNB: ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)
 dTTP: nucleótido 2'-deoxitimidina 5'-trifosfato
 EDAR: Estación de Depuración de Aguas Residuales
 EDTA: etilendiaminatetra acético
 ELT2: *Erythroid-like Transcription Factor 2*
 EMSA: ensayo de retardo de la movilidad electroforética
 EST: secuencias expresadas (*Expressed Sequence Tags*)
 FQ₂: fitoquelatina compuesta por dos repeticiones del dipéptido γ-Glu-Cys

Abreviaturas

FQ₄: fitoquelatina formada por cuatro repeticiones del dipéptido γ -Glu-Cys
FQ_n: fitoquelatina formada por n repeticiones del dipéptido γ -Glu-Cys
FQS: enzima fitoquelatín sintasa
FQs: fitoquelatinas
 γ GT: enzima γ -glutamyl transferasa
GRE: Elemento de respuesta a glucocorticoides (*Glucocorticoid Response Element*)
GSH: glutation
HMW Cd-FQ_n: complejos Cd-FQ de gran masa molecular (*high molecular weight*)
HPLC: cromatografía líquida de alta resolución (*High performance liquid chromatography*)
HSPs: proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*)
IARC: Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (*International Agency for Research on Cancer*)
I: Introducción
IP: yoduro de propidio
IPTG: isopropil- β -D-tiogalactósido
IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*
JNK: c-Jun N-terminal quinasa (*c-Jun N-terminal kinase*)
Kb: kilobases
LB: medio Luria Bertani
LIF-CS espectroscopía confocal de fluorescencia inducida por láser
LMW CdFQ_n: complejos Cd-FQ de baja masa molecular (*low molecular weight*)
LZ: cremallera de leucina
MAC: macronúcleo
MB: *Bayesian Method*
MIC: micronúcleo
ML: método de máxima verosimilitud (*Maximum Likelihood*)
MOPS: ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
MRE: Elemento de respuesta a metales (*Metal Response Element*)
MTCM1: Motivo 1 Conservado en Metalotioneínas (*Metallothionein Conserved Motif 1*)
MTF-1: Factor 1 de transcripción en respuesta a metales (*Metal responsive transcription factor 1*)
MYM: Materiales y Métodos
NJ: *Neighbour-Joining*
nm: nanómetros
nt: nucleótidos
NTC: *no template control*
N-terminal: amino terminal
ORF: Marco abierto de lectura (*Open Reading Frame*)
PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida
pb: pares de bases
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
pm: paramomicina
PMSF: fenil metil sulfonil fluoruro
 P_{MTT1} : promotor del gen *MTT1*
 P_{MTT5} : promotor del gen *MTT5*
PQ: paraquat
psi: unidad de presión básica del sistema inglés (*pounds per inch*)
R: Resultados
R²: coeficiente de correlación
RACE: *Rapid Amplification of cDNA Ends*
RB: región básica
ROS: especies reactivas de oxígeno
rpm: revoluciones por minuto
RT: retrotranscripción
RTPCRq: RT-PCR cuantitativa o en tiempo real
SDS: dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE: electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida
sm1: submódulo de tipo 1
sm2: submódulo de tipo 2

SSA: ácido sulfosalicílico

TAE: tampón Tris/Acetato/EDTA

TEM: Microscopía electrónica de transmisión

TFA: ácido trifluoroacético

US EPA: Agencia de Protección Medio Ambiental de Estados Unidos (*Environmental Protection Agency*)

USF factor de estimulación hacia el extremo 5' (*Upstream stimulator factor*)

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido

Introducción

A. METALES: TOXICIDAD Y MECANISMOS DE RESISTENCIA

A.1 Concepto de metal pesado

Durante las últimas décadas, el término metal pesado ha sido empleado en la literatura científica con una amplia variedad de definiciones contradictorias, basadas en la densidad, masa atómica, número atómico u otras propiedades de los diferentes elementos metálicos y sus derivados (Hodson 2004). El término como tal no ha sido definido aún por ninguna autoridad como la IUPAC, y actualmente es objeto de controversia (Duffus 2002). Algunos autores defienden su uso, a pesar de su imprecisión, por falta de alternativas. Otros, en cambio, abogan por la necesidad de una nueva clasificación en base a las propiedades físico-químicas de cada elemento, y que permita interpretar las bases bioquímicas de su toxicidad (Duffus 2002).

Generalmente en ecotoxicología, este término se emplea para designar a aquellos metales y metaloides tóxicos o potencialmente tóxicos para los seres vivos. Sin embargo, esta definición de metal pesado tampoco sería correcta, puesto que todos los metales son potencialmente tóxicos para los sistemas vivos dependiendo de su concentración o del organismo en cuestión. No obstante, dado que la actual controversia no ha sido resuelta aún, y el término metal pesado está ampliamente extendido en la literatura científica actual, general y medioambiental, en este trabajo seguiremos empleando el término metal pesado.

A.2 Aspectos fundamentales sobre metales

Los metales y sus derivados presentan características únicas que deben ser consideradas a la hora de evaluar el riesgo que éstos representan para la salud humana y el medio ambiente.

- Los metales son componentes naturales cuya concentración varía en diferentes regiones geográficas (Fairbrother *et al.* 2007).

- Los metales se encuentran de forma natural como mezclas de metales, y de esta forma son introducidos también en el medio ambiente a través de vertidos, etc., como consecuencia de las actividades humanas (ATSDR 2004; Fairbrother *et al.* 2007). Así, el efecto de cada metal puede variar a consecuencia de la presencia de otros. Algunos de los metales presentes pueden interaccionar entre sí de forma aditiva, cuando la toxicidad de la mezcla es igual a la suma de la toxicidad de cada metal por separado. Otros en cambio, pueden actuar de forma antagonista o sinérgica, cuando la toxicidad de la mezcla de metales es inferior o superior a la suma de la toxicidad de cada metal por separado respectivamente (Preston *et al.* 2000).

- Los metales son contaminantes persistentes, y al contrario que los compuestos orgánicos, los metales no pueden ser sintetizados ni destruidos mediante procesos biológicos y químicos. En cambio, los metales pueden ser transformados de un estado de valencia a otro. Los diferentes estados de valencia (especies) del mismo metal influyen sobre su bioaccesibilidad y biodisponibilidad, y tienen distintos efectos sobre los sistemas vivos (Fairbrother *et al.* 2007).

Según Semple *et al.* (2004), un compuesto es biodisponible cuando se encuentra en forma libre y puede pasar a través de la membrana citoplasmática, desde el exterior al interior de la célula. Por otro lado la bioaccesibilidad se refiere a la cantidad del metal que es o puede ser disponible dentro de un período de tiempo y condiciones determinadas (Semple *et al.* 2004). La biodisponibilidad de los metales y por tanto su toxicidad, varían ampliamente de acuerdo con las condiciones físico-químicas del medio (pH, potencial redox, concentración de oxígeno, capacidad de intercambio catiónico, salinidad, concentración de materia orgánica, concentración de arcillas, presencia de otros metales, etc.) (Calace *et al.* 2006). De todos ellos, el pH es el factor medioambiental más importante que afecta al comportamiento de los metales (Fairbrother *et al.* 2007), así a pH ácido incrementan su solubilidad y, por lo tanto, biodisponibilidad. Sin embargo, la biodisponibilidad de los metales no depende exclusivamente de factores físico-químicos, sino también de los biológicos. Por un lado, la actividad metabólica de los organismos influye en las condiciones físico-químicas del medio. Y además, los seres vivos pueden afectar a la movilidad y biodisponibilidad del metal mediante procesos como la bioprecipitación, biosorción, quelación y bioacumulación de metales, etc (Bondarenko *et al.* 2008).

- Algunos metales (como Cu, Zn, Mg, Mn, Fe, Co, Na y K) desempeñan funciones imprescindibles para los seres vivos, contribuyen a la estabilización de estructuras y moléculas biológicas, o funcionan como cofactores en multitud de reacciones enzimáticas. Por ello son esenciales para el metabolismo y crecimiento celular, aunque se requieran en concentraciones muy bajas. En cambio, otros (como Cd, Hg, Ag, Pb y Pt) no tienen funciones biológicas conocidas, son considerados como no esenciales, y son muy tóxicos incluso a concentraciones muy bajas.

A.3 Mecanismos de toxicidad de metales

Todos los metales son tóxicos en mayor o menor medida para los seres vivos. Los no esenciales tienen un efecto perjudicial incluso a concentraciones muy bajas. Se ha demostrado que pueden causar la muerte de las células y tejidos por necrosis, y muchos de ellos por un mecanismo de apoptosis (Kang 1997).

Los iones metálicos pueden entrar en la célula mediante dos formas distintas: mediante un mecanismo no específico, debido a un gradiente quimiosmótico a través de la membrana citoplasmática; o mediante un mecanismo altamente específico dependiente de energía (Nies 1999). Una vez dentro de la célula, los cationes metálicos, especialmente aquellos con un gran número atómico (Cd^{2+} , Hg^{2+} y Ag^{2+}), tienden a unirse y bloquear los grupos funcionales $-\text{SH}$ de proteínas, inhibiendo su actividad. Otros metales pueden desplazar elementos esenciales, causar alteraciones conformacionales en la estructura de ácidos nucleicos y proteínas perdiendo su actividad. Además, el exceso de metales en el citosol puede producir directa o indirectamente (dependiendo del metal) estrés oxidativo, estimulando la formación de especies reactivas de oxígeno y radicales libres (Hall 2002; Rico *et al.* 2009). También se han descrito efectos genotóxicos de los metales pesados, consecuencia de la modificación de proteínas que intervienen en la reparación del ADN, o provocando un daño oxidativo en las bases (originando alteraciones como la 8-OH-dG) que provocan mutaciones (Bertin y Averbeck 2006). En la Figura 1 se resumen algunas de las rutas de toxicidad que presentan los metales pesados.

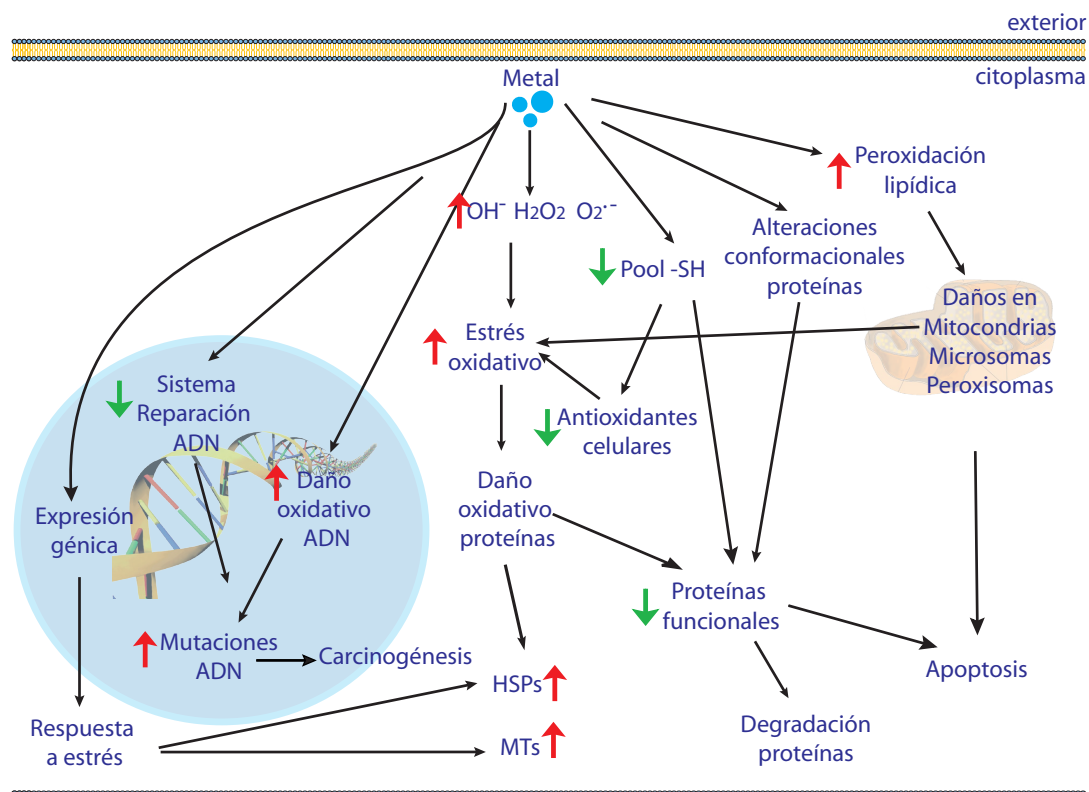


Figura 1. Rutas de toxicidad de metales. HSPs: proteínas de choque térmico. MTs: metalotioneínas. Flecha roja: aumento. Flecha verde: disminución. Modificado a partir de Bertin y Averbeck *et al.* (2006).

A.4 Mecanismos de detoxificación de metales

Todos los metales, especialmente los no esenciales, tienen efectos tóxicos sobre los seres vivos. Por esta razón la célula presenta una serie de mecanismos de resistencia frente a estos contaminantes ambientales (Gadd 2000), que aparecen resumidos en la Figura 2, y se comentan a continuación:

- Bloqueo del transporte intracelular. Este mecanismo de resistencia es típicamente bacteriano, y se expresa ante la presencia de metales no esenciales que utilizan los sistemas de transporte activo de metales esenciales. Por ejemplo, el Cd^{2+} y el As^{4+} entran en la célula a través de los sistemas de transporte de Mn^{2+} y fosfato. La célula bloquea estos sistemas de entrada, y capta el metal esencial por una vía alternativa (Bruins *et al.* 2000).
- Bombeo extracelular del ión metálico. Consiste en expulsar, mediante sistemas de transporte dependientes de energía, los cationes metálicos que se acumulan en el citoplasma. Se han descrito dos sistemas de transporte para expulsar metales: ATPasa de membrana tipo P y el antiporte quimiosmótico catión/ H^+ (Rensing *et al.* 1999). Ejemplo: la ATPasa *cadA*, que proporciona resistencia a Cd^{2+} en *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus* (Silver y Phung 2005).
- Modificación química del ión metálico (Transformación). Mediante procesos metabólicos celulares el ión metálico es transformado a una forma menos tóxica. Las modificaciones más comunes son la reducción o la metilación. Ejemplo: el sistema *mer* (resistencia a Hg^{2+}) de *Pseudomonas aeruginosa* (Silver y Phung 2005).
- Bioacumulación. Consiste en la inmovilización citoplasmática de los cationes metálicos uniéndolos a una molécula ligando y, en algunos organismos, la posterior compartimentalización del complejo molécula ligando-metal. Finalmente el complejo metal-ligando es eliminado de la célula como complejo no tóxico. En los seres vivos existen tres tipos principales de moléculas queladoras de metales pesados implicadas en bioacumulación: las metalotioneínas (MTs), las fitoquelatinas (FQs), y el tripéptido glutathione (GSH). Algunos ácidos orgánicos son potenciales queladores de metales (Rauser 1999), aunque aún no se ha demostrado su implicación en este proceso (Hall 2002).
- Bioprecipitación. Es un mecanismo propio de hongos y bacterias, que son capaces de excretar al medio una serie de productos metabólicos (compuestos reducidos de azufre o ácidos orgánicos) que inmovilizan los cationes metálicos tóxicos de

manera inespecífica (Gadd 2000).

- Bioadsorción. Consiste en la captación inespecífica y pasiva de los iones metálicos por polímeros o estructuras de la superficie celular (paredes, cápsulas). Se da tanto en células viables como no viables, ya que es independiente del transporte y metabolismo celular (Lovley 2000). Este mecanismo aparece en algas (Crist *et al.* 1981) y bacterias (Mann 1990), y a pesar de ser inespecífico presenta cierta afinidad sobre algunos cationes metálicos. Las paredes bacterianas presentan carga negativa a pH ácido o neutro, capturando así los cationes metálicos.

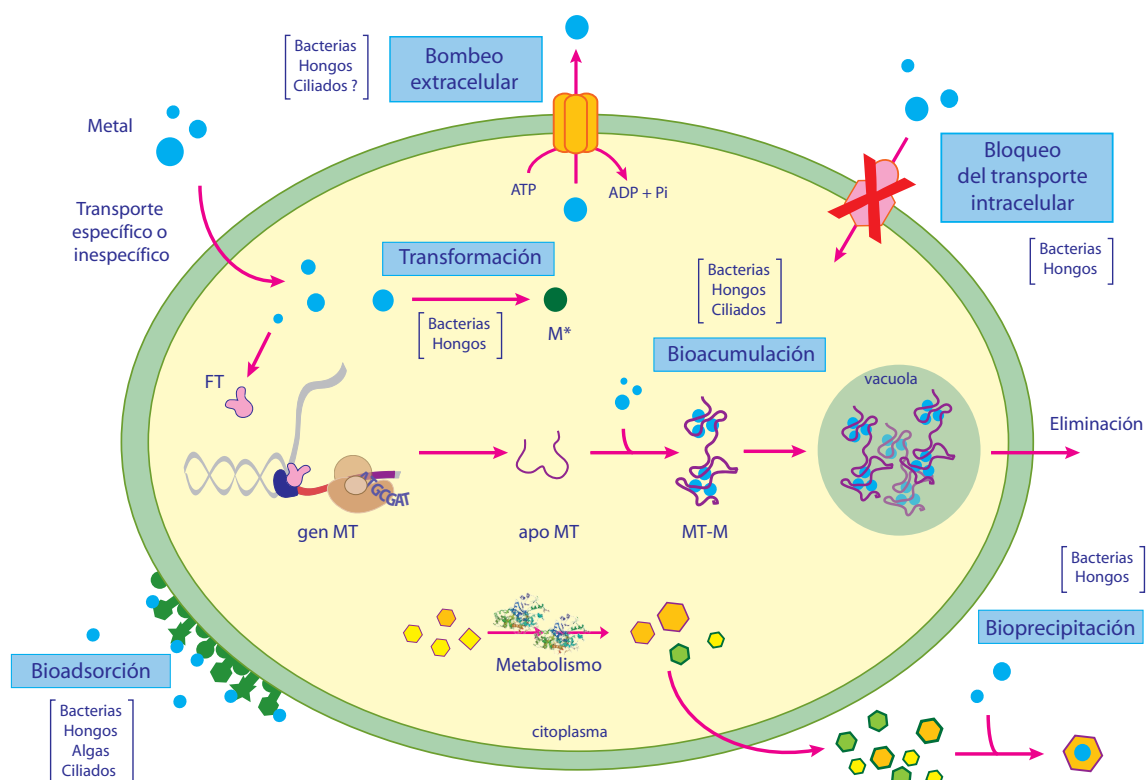


Figura 2. Mecanismos de detoxificación de metales pesados presentes en microorganismos procariotas y eucariotas. M: Metal pesado, M*: Metal reducido o metilado, MT: Metalotioneína, MT-M: Complejo metalotioneína-metal, FT: Factor de Transcripción. Entre paréntesis se indican los grupos de microorganismos que presentan alguno de estos mecanismos. Basado en Gutiérrez *et al.* (2008).

A.5 Mecanismos de detoxificación de metales en ciliados

Poco se conoce aún sobre de los mecanismos de detoxificación de metales en ciliados, siendo la bioacumulación el mejor estudiado en estos microorganismos (Piccinni y Albergoni 1996; Díaz *et al.* 2006), aunque no se descarta la existencia de otros. De los seis mecanismos de resistencia a metales que se conocen (apartado A.4), al menos tres podrían estar presentes en ciliados: bioacumulación, bombeo extracelular del ión metálico y bioadsorción.

Tras la secuenciación completa del genoma macronuclear de *T. thermophila* y *P. tetraurelia* se han encontrado numerosas familias de genes que codifican para hipotéticos transportadores de membrana (Eisen *et al.* 2006; Arnaiz *et al.* 2007). El genoma macronuclear de *T. thermophila* presenta 485 genes putativos codificantes para transportadores de membrana de cationes inorgánicos (Eisen *et al.* 2006), de los cuales 91 son ATPasas de tipo P. Sabemos que algunos de estos genes se expresan, ya que representan entre el 4-8 % de las ESTs identificadas en genotecas de expresión de cultivos del ciliado *T. thermophila* expuestos a As^{5+} , Cd^{2+} o Pb^{2+} durante 1 ó 3 h (Campos *et al.*, no publicado). Por tanto, cabe pensar que algunas de estas ATPasas de membrana, cuya expresión se induce ante estrés por metales, puedan expulsar iones metálicos al exterior celular como mecanismo de defensa.

La bioadsorción de metales ha sido descrita únicamente en quistes maduros del ciliado colpódido *Colpoda inflata* para el Cd^{2+} , evaluando el efecto de detoxificación debido a la bioadsorción del metal por las glicoproteínas y/o carbohidratos de la pared quística, y usando *T. thermophila* como ciliado bioindicador de la toxicidad de la muestra (Gutiérrez *et al.* 2008).

A.5.1 Bioacumulación en ciliados

En diversas especies de ciliados se ha descrito la presencia de inclusiones metálicas en el citoplasma, o en el interior de vacuolas en células expuestas a distintos metales pesados (Nilsson 1978; Martín-González *et al.* 2006). Estas inclusiones se observan como gránulos electrodensos mediante microscopía electrónica de transmisión (Dunlop y Chapman 1981; Iftode *et al.* 1985; Nilsson 1996; Martín-González *et al.* 2006), independientemente del metal empleado: Cd (Krawczynska *et al.* 1989; Coppellotti 1994; Martín-González *et al.* 2005), Au (Nilsson 1997), Bi (Nilsson 1996) o Pb (Nilsson 1978). También se han observado estas inclusiones en algunas especies de microalgas tras una exposición a Cd (Nassiri *et al.* 1997a; 1997b). Es probable que estas acumulaciones representen complejos formados por los cationes metálicos y metalotioneínas, de modo que los metales pesados no se encuentren en forma biodisponible y por lo tanto no sean tóxicos para la célula. Tales acumulaciones metálicas también han sido detectadas en diversos ciliados mediante microscopía de fluorescencia (Díaz *et al.* 2006).

La mayor o menor capacidad de acumular metal en protozoos ciliados es específica de cada cepa, y varía según el tipo de metal, siendo el Zn el metal más frecuentemente acumulado, seguido del Cd y por último el Cu (Gutiérrez *et al.* 2008). Según los trabajos publicados, la bioacumulación de Cu no parece muy frecuente en ciliados, excepto en algunas cepas (Martín-González *et al.* 2006). Aunque se ha demostrado la existencia de Cu-MTs en distintas especies del género *Tetrahymena* (Boldrin *et al.* 2008), los niveles intracelulares de Cu en ciliados podrían estar controlados principalmente por ATPasas de membrana, como sucede en procariotas y eucariotas superiores (Mercer y Llanos 2003; Nies 2003). Esto podría explicar los bajos niveles de bioacumulación de Cu descritos en ciliados (Gutiérrez *et al.* 2008).

En general, la bioacumulación de Cd en ciliados disminuye en presencia de Zn y vice-

versa (Díaz *et al.* 2006; Martín-González *et al.* 2006), al igual que sucede en otros organismos (Rainbow *et al.* 2000; Wicklund Glynn 2001). Esta competencia entre Cd y Zn ha sido descrita en varias especies de ciliados (Nilsson 1989; Coppellotti 1994; Díaz *et al.* 2006).

Las principales moléculas queladoras responsables de la bioacumulación de metales, tienen naturaleza peptídica y pueden ser péptidos sintetizados enzimáticamente (GSH y fitoquelatinas), o proteínas codificadas genéticamente: metalotioneínas (MTs). Todas ellas presentan residuos de Cys con grupos –SH libres a los que se unen los metales pesados. Entre los ciliados, hasta ahora sólo se han descrito metalotioneínas en distintas especies del género *Tetrahymena* (Piccinni *et al.* 1994; Fu y Miao 2006; Díaz *et al.* 2007; Shuja y Shakoori 2007; Guo *et al.* 2008), aunque el año pasado se describió un posible gen de MT en *Paramecium* sp. (Shuja y Shakoori 2008). En la actualidad no se conoce la existencia de fitoquelatinas en ciliados.

B. MOLÉCULAS QUELADORAS DE METALES PESADOS

B. 1 Metalotioneínas

B.1.1 Concepto y funciones biológicas

Las metalotioneínas constituyen una superfamilia de proteínas de baja masa molecular (< 7-10 kDa), generalmente sin histidina ni aminoácidos aromáticos en su secuencia. Son muy ricas en residuos de cisteína (Cys) (23-33 % de la molécula), aminoácido que le confiere la capacidad de inmovilizar iones metálicos, principalmente Cd, Zn o Cu (Coyle *et al.* 2002). Los residuos de Cys se distribuyen en diferentes motivos: Cys-X-Cys, Cys-XX-Cys y Cys-Cys (donde X es un aminoácido distinto a Cys) (Kägi 1991).

Fueron descubiertas en el año 1957 por Margoshes y Vallee, quienes identificaron en el córtex de hígado de caballo una proteína responsable de la acumulación de cadmio (Margoshes y Vallee 1957). Después se demostró que las metalotioneínas además de cadmio, son capaces de unir zinc y cobre (Kägi y Valee 1960; Pulido *et al.* 1966). En la actualidad se ha comprobado que estas proteínas son capaces de unir hasta 17 cationes metálicos distintos, tanto monovalentes como divalentes, aunque según distintos autores, *in vivo* sólo se pueden unir a Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Bi^{2+} , Cu^{+} y Ag^{+} (Kägi y Kojima 1987; Coyle *et al.* 2002). La afinidad con los distintos metales varía según el metal y los tipos de metalotioneínas. La capacidad de quelación también varía, y depende de la estructura de la metalotioneína (Coyle *et al.* 2002).

Desde que en 1957 se purificase la primera metalotioneína de caballo hasta la actualidad, se han descrito más de 200 MTs en diversos organismos. Se han encontrado metalotioneínas en vertebrados (incluidos humanos) e invertebrados (atrópodos, moluscos, equinodermos, nemátodos y anélidos), microorganismos eucariotas (hongos y levaduras, microalgas y protozoos), microorganismos procariotas (cianobacterias y proteobacterias) y en plantas (Ro-

binson *et al.* 1993; Robinson *et al.* 2001) (Tabla 1). A pesar de que las metalotioneínas fueron descubiertas hace más de 50 años y se han producido grandes avances en el conocimiento de su estructura, características bioquímicas, distribución y regulación génica; su función biológica principal continúa siendo enigmática (Palmiter 1998). No obstante, se les han atribuido distintas funciones que incluyen el mantenimiento de la homeostasis de metales pesados esenciales (Cousins 1985), captación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Viarengo *et al.* 2000), protección frente a metales pesados tóxicos (Liu y Klaassen 1996), y frente a xenobióticos (Klaassen y Liu 1998). En mamíferos también se ha descrito su papel protector frente a enfermedades neurodegenerativas (Penkowa y Hidalgo 2000) y en procesos de desarrollo y diferenciación celular (Vidal y Hidalgo 1993).

B.1.2 Clasificación y estructura

Inicialmente las MTs de distintos organismos fueron agrupadas en tres clases distintas (Fowler *et al.* 1987). El descubrimiento de nuevas secuencias hizo que se propusiese una nueva clasificación basada en la similitud de las secuencias aminoacídicas, pero que no tiene en cuenta caracteres funcionales o evolutivos (Valls *et al.* 2001). Esta clasificación considera a las MTs como una superfamilia de proteínas con características comunes, la cual se divide en familias, subfamilias, subgrupos, isoformas o formas alélicas (Binz y Kägi 1999). Actualmente las MTs se clasifican en 15 familias distintas, que agrupan a aquellas MTs que comparten un conjunto específico de caracteres relacionados con la secuencia aminoacídica. Los miembros de una familia no pueden incluirse en otra, y se considera que se trata de organismos relacionados evolutivamente. A cada familia le corresponde un número y rango taxonómico de identificación (Tabla 1).

Muchos autores afirman que en general las MTs no presentan elementos de estructura secundaria (Cobine *et al.* 2004; Bilecen *et al.* 2005; Calderone *et al.* 2005), aunque se pueden encontrar hélices α o láminas β en algunas MTs, como por ejemplo la SmtA descrita en *Synechococcus* sp., la MT-3 de mamíferos, la MT de *Notothenia coriiceps*, o la MT-A de *Strongylocentrotus purpuratus* (Riek *et al.* 1999; Blindauer *et al.* 2001; Capasso *et al.* 2002; Wang *et al.* 2006) (Figura 3). Cuando la MT no está acomplejada con metales (forma apo) presenta una estructura 3D desordenada (*random coil*). Las MTs adquieren su estructura terciaria consecuencia de la coordinación (unión) de metales por los residuos de Cys (Capasso *et al.* 2003).

La estructura tridimensional de las MTs preferentemente inducidas por Cd (Cd-MTs) se ha estudiado principalmente en mamíferos, crustáceos y equinodermos. A pesar de sus diferencias en la secuencia aminoacídica, su estructura tridimensional o 3D es bastante similar (Binz y Kägi 1999). En mamíferos las Cd-MTs se componen de unos 61-68 aminoácidos, de los cuales 20 son residuos de Cys capaces de unir 7 cationes bivalentes preferentemente de Cd o Zn (según la estequiometría $\text{Cd}_7(\text{Cys})_{20}$) (Klaassen *et al.* 1999). Cuando se une a cationes metálicos la apometalotioneína adquiere forma de "yo-yo" y los residuos de cisteína se disponen en

Familia	MT	aa ³	MM (kDa)	%Cys	CCC ⁴	arom ⁶	His ⁷	Estructura 3D (Nter → Cter)	Ejemplos
1	Vertebrados	60-68	6-7	32-34	SI ⁵	0	0-1	Dominio β + Dominio α	RnorMT2, HsapMT2, MmusMT1
2	Moluscos	64-87	7-9	28-30	SI ⁵	0	0-4	Similares a vertebrados. Algunas isoformas pueden tener más de 2 dominios	MedMT10a, CvirMT4, HpomMT1
3	Crustáceos	58-64	8-8,2	31-33	SI ⁵	0	0	Dominio β + Dominio β	HameMTH, CsapMT1b
4	Equinodermos	64-67	6-7	29-31	NO	SI	0	Dominio α + Dominio β	SpurMTA SgraMT1
5	Dípteros	40-43	3,9	25	NO	0	0	Un dominio ²	DmelMT1, DmelMT2, DmelMT3
6	Nemátodos	62-74	6,6-8	25-28	NO	SI	1-4	Un dominio	CmelMT1, CeleMT2
7	Ciliados	99-181	10-19,6	22-30	SI	SI	0-2	Dominio β + Dominio α	TpigMT-1, TpyrMT-1, TtheMTT1
8	Hongos 1	25-27	2,5	27	NO	0	0	Un dominio	NcraMT, AbisMT
9	Hongos 2	63	6,4	28,6	NO	0	3	Un dominio	¹ CglaMT2a
10	Hongos 3	51	5,3	30,8	NO	SI	1	Un dominio	¹ CglaMT2b
11	Hongos 4	54-55	5,8	16-17	SI ⁵	SI	1-2	Un dominio	YlipMT1/MT2/MT3/MT4
12	Hongos 5	61	6,7	19,7	NO	SI	1	Un dominio	¹ ScerCUP1
13	Hongos 6	69	7,3	27,5	NO	0	2	Un dominio	¹ ScerCRS5
14	Bacterias	53-58	6-8	17-19	NO	SI	SI	Un sólo dominio que contiene una α-hélice.	SynSmtA, TvulSmtA
15	Plantas Tipo1	45-75	4,6-7	16-29	NO	SI	0-1	Dos dominios separados por un segmento de 40 aminoácidos	AthaMT1a, PsatMT1a
	Plantas Tipo2	77-81	7,6-8	17-18	NO	SI	0-1		AthaMT2a, OsatMT2
	Plantas Tipo3	60-69	6,4-8	15-17	NO	SI	0-1		AthaMT3, OsatMT3
	Plantas Tipo4	76-81	7,8-8	19-21	NO	SI	0-1		AthaMT4, ZmayMT4,

Tabla 1. Clasificación de las MTs en distintas familias de acuerdo a su estructura primaria (Binz y Kägi 1999). La clasificación interna de las MTs de plantas ha sido sustituida por la propuesta por Cobbet y Goldsbrough (2002). Se muestran algunos ejemplos de MTs pertenecientes a cada una de las familias. ¹La familia actualmente está formada por una sola MT. ²Por semejanza a la CUP1 de *S. cerevisiae* se ha supuesto que la estructura 3D esté formada por un solo dominio. ³aa: número de aminoácidos que presenta la proteína. ⁴CCC: motivos Cys-Cys. ⁵SI: se ha encontrado una isoforma que contiene un motivo CCC en su secuencia. ⁶arom: se indica si alguna isoforma de la familia contiene aa aromáticos. ⁷His: se indica el número de residuos de Histidina que pueden presentar las isoformas de la familia. Estructura 3D: estructura tridimensional o terciaria. MT: metalotioneína. MM: masa molecular. Abis: *Agaricus bisporus*. Atha: *Arabidopsis thaliana*. Cele: *C. elegans*. Cgla: *C. glabrata*. Csap: *Callinectes sapidus*. Cvir: *Crassostrea virginica*. Dmel: *D. melanogaster*. Hame: *Homarus americanus*. Hpom: *Helix pomatia*. Hsap: *Homo sapiens*. Lpic: *Lytechinus pictus*. Medu: *Mytilus edulis*. Mmus: *Mus musculus*. Ncra: *Neurospora crassa*. Osat: *Oryza sativa*. Psat: *Pisum sativum*. Rnor: *Rattus norvegicus*. Scer: *S. cerevisiae*. Spur: *Strongylocentrotus purpuratus*. Syn: *Synechococcus* sp Tpig: *T. pigmentosa*. Tpyr: *T. pyriformis*. The: *T. thermophila*. Tvul: *Thermosynechococcus vulcanus*. Zmay: *Zea mays*.

dos dominios, denominados α (carboxilo-terminal) y β (amino-terminal) (Klaassen *et al.* 1999) (Figura 3). En el bivalvo marino *Crassostrea gigas* (Tanguy y Moraga 2001) se ha propuesto un modelo 3D para una Cd-MT (CgMT2) consistente en un dominio α y 2 β , siendo la duplicación del dominio β una consecuencia de la respuesta de adaptación al estrés inducido por metal.

Con respecto a las metalotioneínas preferentemente inducidas por Cu (Cu-MTs), parece existir una mayor diversidad, tanto en la secuencia aminoacídica como en la estructura 3D, aunque sólo se han analizado en muy pocos grupos biológicos. La estequiometría propuesta para Cu-MTs con un número de residuos de Cys similar a las Cd-MTs de mamíferos es $\text{Cu}_{12}(\text{Cys})_{20}$ (Klaassen *et al.* 1999). La Cu-MT mejor conocida y la que primero se caracterizó fue la proteína CUP1 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Winge *et al.* 1985) (Figura 3) que, al igual que la Cu-MT del hongo *Neurospora crassa*, presenta una estructura similar al dominio β de las Cd-MTs de mamíferos (Hamer 1986). Sin embargo, en algunos crustáceos las Cu-MTs presentan 2 dominios β (Valls *et al.* 2001). En mamíferos, en cambio, aún no se ha analizado la estructura 3D de ninguna Cu-MT.

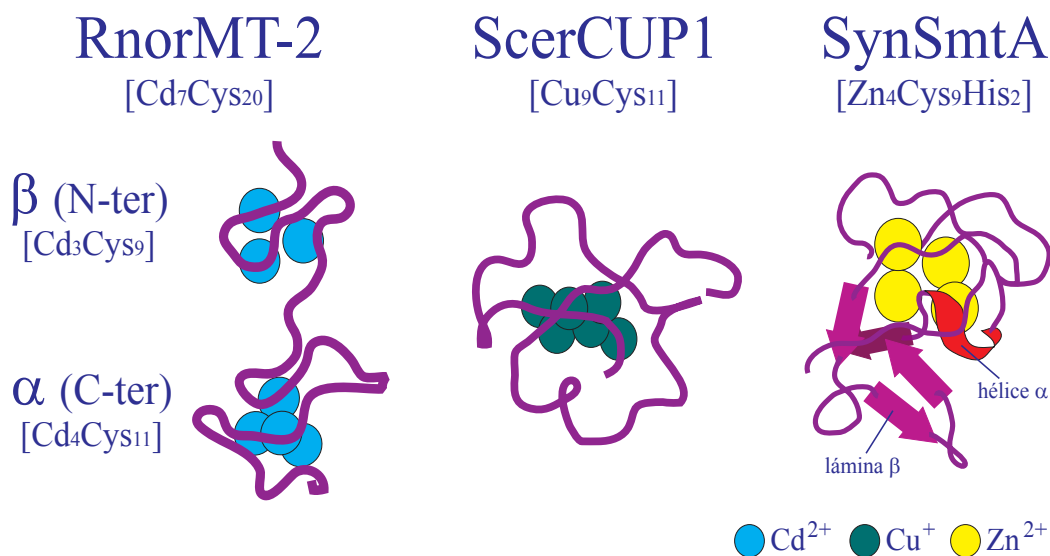


Figura 3. Ejemplos de estructura tridimensional de metalotioneínas de distintos organismos. RnorMT-2: MT-2 de *Rattus norvegicus* (PDB N° 4MT2). ScerCUP1: CUP1 de *Saccharomyces cerevisiae* (PDB N° 1AQR). SynSmtA: SmtA de *Synechococcus* sp. (PDB N° 1JJD). Representación esquemáticas basadas en la estructura 3D disponibles en la base de datos MMDB (*Molecular Modeling Database*) del NCBI. Entre paréntesis se indica la estequiometría de la capacidad queladora de iones metálicos de cada MT o de cada dominio, si la estructura está compuesta por más de un dominio (RnorMT-2).

B.1.3 Regulación de la biosíntesis de metalotioneínas

La biosíntesis de las MTs se induce por una gran variedad de estímulos. Entre ellos se encuentran metales, agentes oxidantes y citotóxicos, hormonas y factores de crecimiento, antibióticos, agentes inflamatorios y citoquinas, radiaciones, y otros agentes que son interpretados por la célula como señales de estrés celular (Kägi 1993; Haq *et al.* 2003). Además, sus niveles de expresión se modifican durante el desarrollo, el envejecimiento y procesos patológicos como el cáncer (Miles *et al.* 2000).

Aunque también hay indicios de regulación postranscripcional (Haq *et al.* 2003), la expresión de las MTs está regulada principalmente a nivel transcripcional, debido a la existencia de elementos de respuesta o elementos *cis* en la región promotora de los genes que las codifican, a los que se pueden unir distintos factores de transcripción (Tabla 2). Algunos de ellos son esenciales para la expresión basal, mientras que otros activan la transcripción en respuesta a diferentes estímulos.

La regulación transcripcional de los genes de MTs se ha estudiado en vertebrados (humanos, ratón y peces), invertebrados (insectos, nemátodos y moluscos), plantas y microorganismos eucariotas (levaduras) (Radtke *et al.* 1993; Brugnera *et al.* 1994; Liu y Thiele 1997; Whitelaw *et al.* 1997; Auf der Maur *et al.* 1999; Moilanen *et al.* 1999; Shen y Clark 2001; Zhang *et al.* 2001; Bourdineaud *et al.* 2006; Jenny *et al.* 2006; Lu *et al.* 2007).

En la región promotora de los genes de MTs de diversos organismos (Tabla 2) se han identificado múltiples secuencias cortas similares entre sí, denominadas MREs (elementos de respuesta a metales). Parece que los MREs, cuya secuencia consenso es TGC(G/A)CNC (donde N es cualquier nucleótido de ADN), están implicados en la expresión basal y la activación de la transcripción por algunos metales y estrés oxidativo (Andrews 2000; Haq *et al.* 2003).

En humanos, ratones, peces, levaduras e insectos se ha identificado el factor de transcripción MTF-1 (factor-1 de transcripción en respuesta a metales), que se une a las secuencias MREs activando la transcripción de los genes MT (Westin y Schaffner 1988). MTF-1 presenta en su región N-terminal 6 dominios en dedos de zinc (Andrews 2000). Es esencial para la expresión basal de estas MTs y la inducción por metales y estrés oxidativo (Heuchel *et al.* 1994; Andrews 2000; Haq *et al.* 2003).

MTF-1 se expresa constitutivamente en humanos y ratón. Como consecuencia del estrés generado por la exposición a metales MTF-1 se transloca desde el citoplasma al núcleo (Smirnova *et al.* 2000), donde se une a los MRE activando la transcripción del gen MT. Según el modelo propuesto, MTF-1 requiere Zn^{2+} para unirse al ADN (Haq *et al.* 2003), por tanto el Zn^{2+} induciría la expresión de los genes MTs activando directamente a MTF-1 para que éste se una a los MREs de la región promotora. El resto de metales no pueden unirse y activar a MTF-1, de modo que inducen la expresión de los genes MT por otras vías. El Cd es altamente reactivo e induce estrés oxidativo y disminución de los niveles de GSH (Stohs y Bagchi 1995). El estrés oxidativo causado por la exposición a Cd podría activar la transcripción de los genes

MT directamente a través de la unión de MTF-1 a ARE (elementos de respuesta antioxidantes), e indirectamente aumentando los niveles citoplasmáticos de Zn^{2+} de la reserva celular de Zn que se encuentra unido a proteínas (nivel basal de MTs u otras proteínas). Esto último, en cambio, no concuerda con los resultados de expresión de MTs de peces y moluscos publicados por Bourdineaud *et al.* (2006), por lo que aún no está claro cómo el Cd activa indirectamente la transcripción a través de MTF-1.

Muchos promotores de genes MT contienen secuencias ARE (Andrews 2000). Presentan una secuencia consenso GTGACNNNGC, e intervienen en la respuesta a agentes oxidantes, así como a algunos metales y diversos compuestos xenobióticos (Dalton *et al.* 1997; Lee *et al.* 1999). En el promotor de la MT-1 de ratón se ha identificado un elemento ARE que contiene un sitio de unión del factor de reconocimiento USF (factor de estimulación hacia el extremo 5'), implicado en la inducción de la expresión de dicha MT-1 en respuesta a la presencia de Cd o H_2O_2 (Andrews 2000) (Tabla 2).

Otras secuencias reguladoras de la expresión de MTs son las secuencias GRE (elementos de respuesta a glucocorticoides), a los que se une el receptor activado de estas hormonas. Participan en la respuesta a glucocorticoides, y aparecen en el promotor de genes MTs de mamíferos (Kelly *et al.* 1997) (Tabla 2).

En los promotores de genes MT de algunos organismos también se han identificado distintos sitios de unión de factores GATA ([A/T]GATA[A/G]) (Moilanen *et al.* 1999), AP-1 (TGA[G/C]TCA) (Stephen *et al.* 1995; Jenny *et al.* 2006), y cajas GC (GGGGCGGGG) a la que se unen factores de transcripción con dedos de Zn de la familia Sp/XKLF, como Sp1 (Haq *et al.* 2003), y que participa en la expresión basal de las MTs (Tabla 2).

Mamíferos (<i>H. sapiens</i>)		Insectos (<i>D. melanogaster</i>)		Nemátodos (<i>C. elegans</i>)		Levaduras (<i>S. cerevisiae</i>)		Moluscos (<i>C. virginica</i>)		Plantas (<i>L. esculentum</i>)	
E cis	FT	E cis	FT	E cis	FT	E cis	FT	E cis	FT	E cis	FT
MRE	MTF-1	MRE	MTF-1					MREs	¿?	MREs?	¿?
ARE	USF	ARE	¿?	ARE	¿?						
								USF	USF		
GRE	Gluc-R										
CajaGC	Sp1										
BLE	AP-1										
	AP-2										
CCAAT	C/EBP										
		AP-1	AP-1			YAP-1	YAP-1	AP-1	AP-1		
						YAP-2	YAP-2				
				GATA	ELT2						
					ELT2 /¿?						
						UAS	Ace1				
						Hsp	Hsp				
								CEBP	CEBP		

Tabla 2. Elementos *cis* (E *cis*) identificados en los promotores de genes MT de distintos organismos. Se indica además el factor de transcripción (FT) que se une a cada elemento. Entre paréntesis se indican algunos ejemplos de los organismos cuyos promotores MT han sido analizados. El significado de cada elemento *cis* y factor de transcripción se detalla en el texto. ¿?: aún se desconoce qué factor de transcripción.

B.1.4 Metalotioneínas en ciliados

Las metalotioneínas de ciliados se han incluido en la familia 7 de la clase II (Binz y Kägi 1999), aunque este grupo no está actualizado ya que sólo se incluye una secuencia de 105 aminoácidos, probablemente correspondiente a las Cd-MTs de *T. pyriformis* y *T. pigmentosa* (Piccinni *et al.* 1994). En la actualidad se conocen nuevas Cd-MTs y Cu-MTs en ciliados, siendo necesario una actualización de esta familia, y la creación de subfamilias dentro de ella. Las secuencias de MT de ciliados que se han descrito y estudiado corresponden exclusivamente a distintas especies del género *Tetrahymena*, pero probablemente existan igualmente en otros ciliados. Recientemente se ha identificado el gen codificante de una hipotética MT en el genoma macronuclear de *Paramecium sp.* (Shuja y Shakoori 2008), aunque aún no se ha analizado su expresión en respuesta a estrés por metales.

Tradicionalmente se ha considerado que las MTs de *Tetrahymena* se dividen en dos grupos distintos que muestran entre sí una identidad de secuencia relativamente baja. Un grupo es inducido más eficientemente por Cd (Cd-MTs), mientras que el otro lo es por Cu (Cu-MTs). La primera Cd-MT de ciliados, la MT-1 de *T. pyriformis*, fue identificada en 1994, y el gen que la codifica secuenciado en 1999 (Piccinni *et al.* 1999). Posteriormente, en *T. thermophila* se aisló el gen denominado *MTT1* (Shang *et al.* 2002), que codifica una isoforma de MT-1 de *T. pyriformis*. En el 2003 se aisló el ADNc de una nueva Cd-MT en *T. thermophila*, que se denominó *MTT3* (Díaz *et al.* 2003; Díaz *et al.* 2005). Los genes *MTT1* y *MTT3* se localizan en el brazo izquierdo del cromosoma micronuclear número 4, separadas únicamente por una distancia de 1,7 kb, y sus secuencias aminoacídicas presentan un 79,6 % de identidad, lo que sugiere que su origen se deba a una duplicación génica. Tras la secuenciación completa del genoma macronuclear de *T. thermophila*, se identificó el gen *MTT5* (Rico *et al.* 2003; Amaro *et al.* 2005), como resultado de una búsqueda de secuencias homólogas a *MTT1* en el genoma de este ciliado. Este gen codifica la tercera isoforma de Cd-MT en *T. thermophila* que se localiza en el cromosoma micronuclear número 5, y su secuencia ha sido aislada como ADNc por dos grupos de investigación distintos (Amaro *et al.* 2005; Santovito *et al.* 2007).

Por otra parte, en *Tetrahymena* también se han identificado MTs inducidas preferentemente por Cu. En 2001 Santovito y colaboradores obtuvieron la secuencia de una putativa Cu-MT (MT-2) en *T. pigmentosa*. En *T. thermophila* se han identificado dos genes que codifican para dos isoformas de Cu-MTs situadas en el brazo derecho del cromosoma micronuclear número 2, denominados *MTT2* y *MTT4* (Bakshandeh *et al.* 2004; Boldrin *et al.* 2006). Presentan un 99 % de identidad nucleotídica y un 98 % de identidad a nivel de secuencia aminoacídica, sugiriendo que el origen de estos genes se deba a una duplicación génica relativamente reciente. Esta duplicación se extiende a las regiones 5' y 3' UTR de los mismos, y ambas ORFs se encuentran separadas por 1,4 Kb. Para explicar esta duplicación génica se ha propuesto un mecanismo de retrotransposición potencialmente presente en *Tetrahymena* (Bakshandeh *et al.* 2004).

Así, con el genoma macronuclear de *T. thermophila* completamente secuenciado, sa-

bemos que este ciliado presenta tres isoformas génicas de Cd-MTs (*MTT1*, *MTT3* y *MTT5*) y dos isoformas de Cu-MTs (*MTT2* y *MTT4*).

En los dos últimos años, y paralelamente al desarrollo de esta tesis doctoral, se han aislado nuevos genes codificantes de Cd-MTs en otras especies del género *Tetrahymena* (*MTT1* en *T. tropicalis* (Shuja y Shakoori 2007), *MT-1* en *T. pigmentosa* (Guo *et al.* 2008), y *MT-2* en *T. pyriformis* (Fu y Miao 2006), los cuales serán analizados y comparados con los resultados que se presentan en este trabajo, y extensamente discutidos en la sección de Discusión.

B.2 Fitoquelatinas

B.2.1 Fitoquelatinas y fitoquelatín sintasa

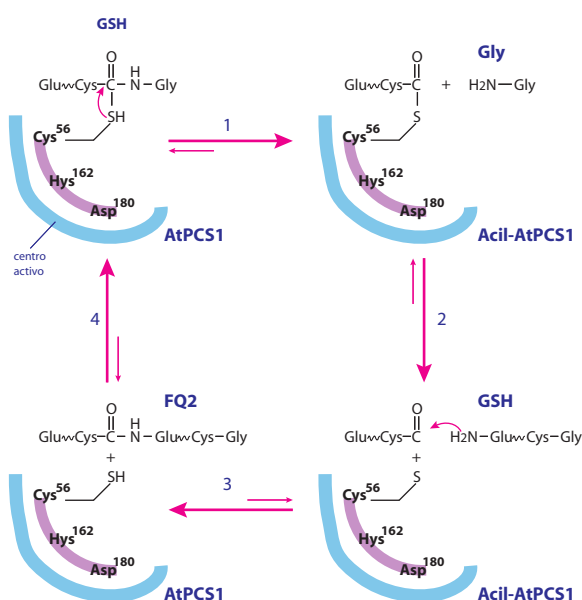
Las fitoquelatinas (FQs) son pequeños oligopéptidos sintetizados enzimáticamente a partir del glutatión (GSH) por la enzima fitoquelatín sintasa (FQS) (γ -glutamylcysteinyltransferasa; EC 2.3.2.15), en respuesta a estrés por metales pesados. Las FQs presentan la estructura general $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, ($n=2\text{-}11$) aunque se han identificado variantes estructurales en algunas especies de plantas, por ejemplo $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-}\beta\text{-Ala}$, $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Ser}$, y $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Glu}$ (Rauser 1995; Zenk 1996). Se identificaron por primera vez en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* (Kondo *et al.* 1984) y después en plantas (Grill 1985). Inicialmente se denominaron cadistidinas, han recibido varios nombres durante años (incluyendo el de MTs de Clase III), pero el término fitoquelatinas es el adoptado en la actualidad. Se agrupan en 5 familias, y se han encontrado en todas las plantas examinadas, microalgas, algunas especies de levaduras y hongos filamentosos (*S. pombe*, *S. cerevisiae* y *Neurospora crassa*) (Grill 1985; Kneer *et al.* 1992), y en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Clemens *et al.* 2001).

La actividad enzimática como tal fue identificada por Grill *et al.* (1989) a partir de un cultivo celular de *Silene cucubalis*, y los primeros genes FQS fueron identificados en las plantas *Arabidopsis thaliana* (Vatamaniuk *et al.* 1999; Ha *et al.* 1999) y *Triticum aestivum* (Clemens *et al.* 1999), la levadura *S. pombe* (Ha *et al.* 1999), y más tarde en el nemátodo *C. elegans* (Clemens *et al.* 2001). Todas las secuencias aminoácidas de las FQS presentan un dominio conservado N-terminal, responsable de la actividad catalítica de la enzima (Ruotolo *et al.* 2004); y un dominio variable C-terminal, que actúa como elemento sensor de metales (Cobbett 2000) y contribuye a la mayor actividad y estabilidad de la proteína, permitiendo que la enzima responda a un espectro más amplio de iones metálicos (Ruotolo *et al.* 2004; Vestergaard *et al.* 2008).

B.2.2 Mecanismo catalítico de síntesis de fitoquelatinas

El mecanismo catalítico de síntesis de fitoquelatinas por la FQS es un mecanismo de sustitución enzimática, la enzima presenta dos sitios de unión y acilación de los sustratos: uno de alta y otro de baja afinidad por el GSH (Vatamaniuk *et al.* 2000). La Cys⁵⁶ (residuo conservado

en todas las FQS, que junto con la His¹⁶² y el Asp¹⁸⁰ forma la triada catalítica de la enzima presente en el extremo N-terminal), es indispensable para la síntesis de fitoquelatinas, y representa el primer sitio de acilación; mientras que el segundo sitio probablemente se localiza en el dominio C-terminal (Clemens 2006; Rea 2006). En primer lugar se produce el ataque nucleofílico de la Cys⁵⁶ (del centro activo de la enzima) sobre el C carbonílico del GSH (1, Figura 4), formándose



se el intermediario γ Glu-Cys~acil-enzima (2, Figura 4) y liberándose la Gly del GSH. Estos dos pasos son independientes de la presencia de metal en el medio. En presencia de Cd²⁺ (u otro metal), se da también la unión de la molécula aceptora (GSH o FQn) al segundo sitio de acilación de la enzima (Rea *et al.* 2004). Se produce entonces el ataque nucleofílico de la molécula aceptora sobre el intermediario γ Glu-Cys~acil-enzima (3, Figura 4), resultando así la reacción de transpeptidación que comporta la síntesis de fitoquelatinas (FQ₂ o FQ_{n+1}).

Figura 4. Mecanismo catalítico de síntesis de FQs por la enzima fitoquelatín sintasa AtPCS1 de *A. thaliana*. Se representa la triada catalítica (Cys⁵⁶, His¹⁶², Asp¹⁸⁰) del centro activo de la enzima. Tomado de Vatamaniuk *et al.* (2004).

B.2.3 Función biológica de la enzima fitoquelatín sintasa

En la última década, mediante análisis de genomas y secuencias ESTs, se han identificado genes homólogos a FQS en organismos representativos de todos los reinos eucariotas (Tabla 3), en muchos de los cuales, en cambio, no se ha detectado la existencia de fitoquelatinas (Clemens 2006). Además, en cianobacterias se ha identificado un grupo de proteínas homólogas a las FQs (Clemens 2006). Estas proteínas, con una masa comprendida entre 23-35 kDa, presentan solamente el dominio conservado N-terminal con la triada catalítica (Harada *et al.* 2004). Tampoco se han detectado fitoquelatinas en estas bacterias, incluso tras una exposición prolongada a Cd. La posibilidad de que la proteína procariota homóloga a FQS pueda representar un ancestro de las FQs eucariotas ha sido analizada por dos grupos distintos (Tsuji *et al.* 2004; Harada *et al.* 2004), quienes concluyeron que la única actividad de la enzima procariota es la conversión del GSH en γ -Glu-Cys con la eliminación de la Gly, en lugar de la biosíntesis de FQs. Una actividad similar se ha descrito recientemente en una FQS (AtPCS1) de *A. thaliana*, y que parece estar involucrada en la degradación de conjugados de GSH además de la detoxificación de metales (Blum *et al.* 2007).

Phylo	Especie	Secuencia ¹	Regulación ² ARNm Proteína	FQs ³	Referencia
EUCARIOTA	<i>Viridiplantae: Chlorophyta</i>	<i>?</i>	<i>?</i>	<i>?</i>	SI (Hirata et al. 2001)
	<i>Metazoa: Amelida</i>	ARNm	+Cd	<i>?</i>	<i>?</i> (Brulle et al. 2008)
	<i>Metazoa: Nematoda</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i> ARNm	<i>?</i>	<i>?</i>	SI (Clemens et al. 2001)
	<i>Metazoa: Chordata</i>	<i>C. briggsae, C. remanei</i> ADNg/EST	<i>?</i>	<i>?</i>	NCBI
	<i>Metazoa: Chordata</i>	<i>Ciona intestinalis, C. savignyi</i> ARNm	<i>?</i>	<i>?</i>	NCBI
	<i>Metazoa: Chordata</i>	<i>Hydra magnipapillata</i> EST	<i>?</i>	<i>?</i>	NCBI
	<i>Metazoa: Arthropoda</i>	<i>Chironomus sp</i> <i>?</i>	<i>?</i>	<i>?</i>	<i>?</i> Cobbet & Dietrich, no publicado
	<i>Metazoa: Echinodermata</i>	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> EST/ADNg/ARNm	<i>?</i>	<i>?</i>	<i>?</i> NCBI
	<i>Metazoa: Platyhelminthes: Trematoda</i>	<i>Schistosoma japonicum</i> ARNm/EST	<i>?</i>	<i>?</i>	<i>?</i> NCBI
	<i>Fungi: Dikarya: Ascomycota</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> ARNm/ADNg	<i>?</i>	<i>?</i>	SI (Ha et al. 1999)
		<i>S. japonicus</i> ARNm	<i>?</i>	<i>?</i>	<i>?</i> NCBI
		<i>Neurospora crassa</i> ARNm/ADNg	<i>?</i>	<i>?</i>	<i>?</i> (Kner et al. 1992)
	<i>Stramenopiles: Bacillariophyta</i>	<i>Thalassiosira pseudonana</i> ADNg	<i>?</i>	<i>?</i>	<i>?</i> NCBI
		<i>Paedacyllum tricornutum</i> EST	<i>?</i>	<i>?</i>	<i>?</i> NCBI
BACTERIA	<i>Stramenopiles: Oomycetes: Peronosporales: Phytophthora</i>	<i>Phytophthora sojae, P. infestans</i> EST	<i>?</i>	<i>?</i>	<i>?</i> NCBI
	<i>Euglenozoa: Kinetoplastida</i>	<i>Trypanosoma cruzi, T. brucei</i> ADNg	<i>?</i>	<i>?</i>	<i>?</i> NCBI
	<i>Euglenozoa: Euglenida</i>	<i>Euglena gracilis</i> <i>?</i>	<i>?</i>	<i>?</i>	<i>?</i> (Aviles et al. 2005)
	<i>Choanoflagellata</i>	<i>Monosiga brevicollis MXI</i> ADNg	<i>?</i>	<i>?</i>	<i>?</i> NCBI
	<i>Amoebozoa: Mycetozoa: Dictyosteliida</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i> EST/ARNm	<i>?</i>	<i>?</i>	SI (Cobbett y Goldsrough 2002) ¹
	<i>Alveolata: Ciliophora</i>	<i>Tetrahymena thermophila</i> ARNm/ADNg	<i>?</i>	<i>?</i>	<i>?</i> Este trabajo
		<i>Paramecium tetraurelia</i> ADNg	<i>?</i>	<i>?</i>	<i>?</i> NCBI
	<i>Cyanobacteria⁴</i>	<i>Nostoc sp PCC7120</i> ADNg	<i>?</i>	<i>?</i>	NO NCBI
		<i>Anabaena variabilis</i> ADNg	<i>?</i>	<i>?</i>	<i>?</i> NCBI
		<i>Prochlorococcus marinus</i> ADNg	<i>?</i>	<i>?</i>	<i>?</i> NCBI
		<i>Trichodesmium erythraeum</i> ADNg	<i>?</i>	<i>?</i>	<i>?</i> NCBI
	<i>Proteobacteria⁴</i>	<i>Burkholderia (varias especies)</i> ADNg	<i>?</i>	<i>?</i>	<i>?</i> NCBI

Tabla 3. Organismos procariotas y eucariotas que presentan genes FQs o secuencias homólogas a genes FQs. ¹:Se indica si la secuencia del gen FQs ha sido aislada como ADNng, ARNm o EST. ²:Se indican aquellos casos en que se ha descrito regulación por metales a nivel transcripcional (ARNm) o posttranscripcional (proteína FQs). NO: no existe regulación por metales. +Cd: el Cd induce la expresión de ARNm o síntesis de la proteína. NO/+Cd: existe o no inducción por Cd dependiendo del órgano de la planta. ³:Se indica si se han identificado FQs en cada organismo. *?*: Se desconoce porque no se ha investigado. ⁴:sólo se citan algunas especies a modo de ejemplo.

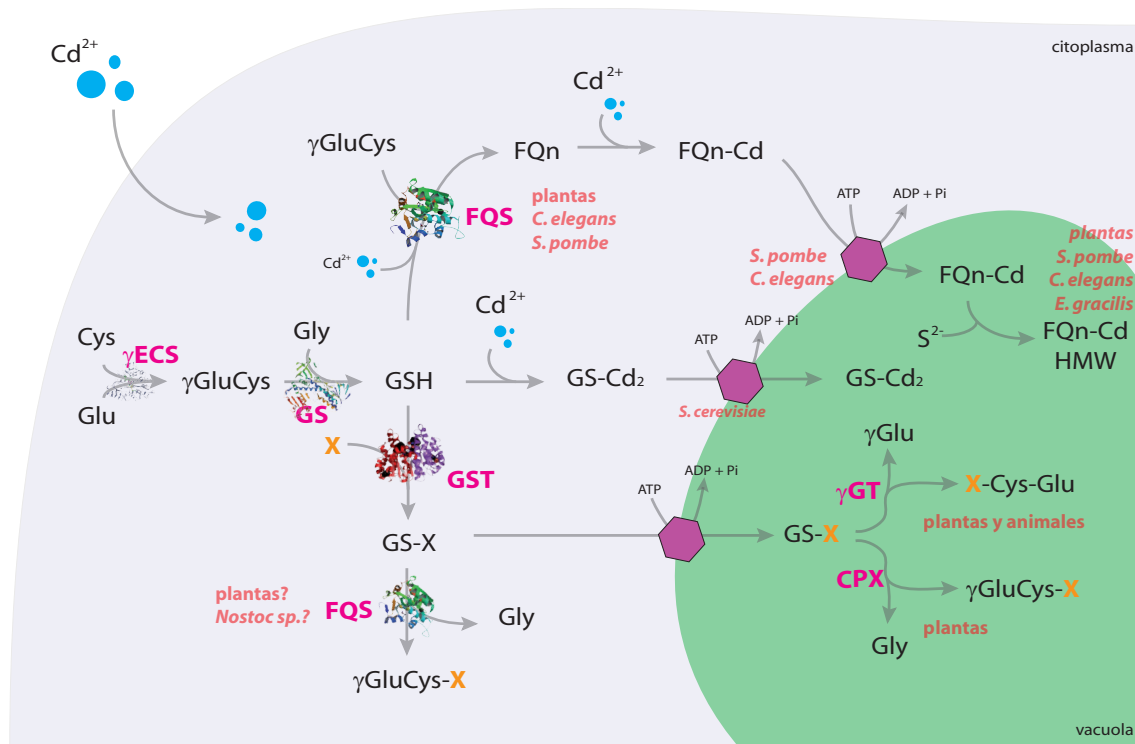


Figura 5. Representación esquemática del metabolismo celular del GSH en distintos organismos. γ ECS: γ -glutamil cisteinil sintasa, GS: glutatión sintasa, GST: glutatión-S-transferasa, FQS: fitoquelatín sintasa, γ GT, γ -glutamil transpeptidasa, CPX: carboxipeptidasa, X: xenobiótico, GSH: glutatión, GS-Cd₂: complejo Cd-GSH, FQn: fitoquelatina, FQn-Cd: complejo FQ-Cd, FQn-Cd HMW: complejo FQ-Cd de gran masa molecular.

Se cree que la principal función de las fitoquelatinas es la detoxificación de metales pesados. Hasta ahora se ha demostrado que las FQs participan en la detoxificación de Cd, As y Hg (Schat *et al.* 2002). La contaminación ambiental por la exposición a grandes cantidades de metales como Cd, As o Hg, es un fenómeno relativamente reciente debido a las actividades industriales humanas (Cazale y Clemens 2001). Por tanto, cabe preguntarse si esto puede haber representado una presión evolutiva suficiente para mantener los genes FQS en todo el reino vegetal y en otros organismos, muchos de los cuales no presentan FQs. Se desconoce también por qué los genes FQS se expresan constitutivamente en organismos que no presentan FQs, e incluso en varios órganos de la planta que no están expuestos a metales (Rea *et al.* 2004).

Para explicar esto actualmente hay dos hipótesis. La más reciente es que la FQS desempeña una importante función en el catabolismo del GSH (Figura 5). La única actividad catalítica de la FQS procariota (NsPCS) es precisamente la hidrólisis del GSH (Harada *et al.* 2004; Tsuji *et al.* 2004; Vivares *et al.* 2005). Recientemente se ha demostrado que las FQSs de *A. thaliana* (AtPCS1) y *S. cucubalis* (ScPCS) pueden hidrolizar conjugados de GSH eliminando la Gly (Beck *et al.* 2003; Blum *et al.* 2007). Se cree que esta reacción representa el primer paso del catabolismo de conjugados de GSH en plantas, y que no excluye la biosíntesis de FQs por estas FQSs.

La otra hipótesis es que las FQs puedan estar implicadas en el mantenimiento de la homeostasis de metales esenciales (Rauser 1990). Recientemente se ha demostrado que la síntesis de FQs contribuye significativamente a la detoxificación de Zn^{2+} en *A. thaliana* (Tennstedt *et al.* 2008). Y además se ha comprobado la existencia de una elevada tolerancia a exceso de Zn^{2+} en *Brassica juncea* transformada con el gen de la FQS de *A. thaliana* (AtPCS1) (Gasic y Korban 2007).

B.2.4 Mecanismo de detoxificación de metales por fitoquelatinas

El mecanismo de detoxificación es más complejo que una simple quelación del metal por las fitoquelatinas. El cadmio debe unirse a GSH o FQn, para formar complejos tiolato-metal que se unan a la enzima FQS activándola. Las FQs sintetizadas en el citosol quelan los iones de Cd, formando los complejos CdFQn de bajo peso molecular (LMW CdFQn) (Figura 5), que entran en las vacuolas a través de transportadores de tipo ABC. Dentro de éstas, los complejos CdFQn se combinan entre sí, uniéndose a más Cd y formando los complejos CdFQn de alto peso molecular (HMW Cd-FQn), que además están estabilizados por átomos de azufre (Cobbett 2000) (Figura 5). En plantas y levaduras se ha comprobado la compartimentalización de estos complejos en vacuolas. En *S. pombe* se ha demostrado que los mutantes *hmt1*, deficientes en un transportador vacuolar de tipo ABC, presentan un fenotipo sensible a cadmio (Ortiz *et al.* 1992). Igualmente, en *C. elegans* existe otro transportador semejante (Vatamaniuk *et al.* 2005), y además se ha comprobado que varias mutaciones que afectan a transportadores ABC confieren sensibilidad a metales pesados.

C. DETECCIÓN Y SEGUIMIENTO DE METALES EN EL MEDIO AMBIENTE. BIOSENSORES

C.1 Contaminación por metales, un grave problema ambiental

Los metales se encuentran de forma natural en el medio ambiente, en su mayoría inmovilizados y por tanto, en forma no biodisponible para los seres vivos. Sin embargo, como consecuencia de las actividades humanas, su presencia se ha incrementado alarmantemente en el aire y en la mayoría de ecosistemas terrestres y acuáticos, alterando los procesos biogeoquímicos naturales (Nriagu y Pacyna 1988). En el último siglo se ha extraído en minería el 90 % del total de cadmio, zinc, cobre, plomo y níquel extraídos a lo largo de la historia (Hill 2004). Estos hechos, sumado a los accidentes ambientales producidos en las últimas décadas, como el ocurrido en abril del 1998 en Aznalcóllar (Sevilla), han convertido a la contaminación por metales en uno de los principales problemas medioambientales actuales.

A diferencia de otros contaminantes ambientales, los metales no pueden ser destruidos por procesos físico-químicos o biológicos, sino que persisten en el medio ambiente y se fijan con relativa facilidad a los sedimentos con abundante materia orgánica (National Research Council (U.S.). *Committee on Bioavailability of Contaminants in Soils and Sediments* 2003). Incluso experimentan un proceso de bioacumulación a su paso por los distintos niveles de la cadena trófica (Kong *et al.* 1995; Chang *et al.* 1996; Seebaugh *et al.* 2005). Los metales son elementos de reconocida toxicidad en la mayoría de los seres vivos. La Agencia de Protección Medioambiental Norteamericana (US EPA, *Environmental Protection Agency*) sitúa a los metales entre los contaminantes más peligrosos para la salud (Hill 2004). Por ejemplo, el cadmio está considerado como un carcinógeno de categoría 1 por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, *International Agency for Research on Cancer*).

C.2 Detección y evaluación de metales en el medio ambiente

La conciencia medioambiental sobre este problema está aumentando entre consumidores e industrias, al tiempo que las leyes se hacen más estrictas. Del reconocimiento de los efectos tóxicos de los metales, incluso a concentraciones muy bajas, ha resultado la creación de una directiva de la regulación de su presencia en el medio ambiente a bajas concentraciones (Directiva 86/278/CEE). Sin embargo, la legislación ambiental determina cuáles son las concentraciones de metales aceptables en el medio, pero considerando los metales de forma independiente, incluso cuando están presentes en mezclas (Walker *et al.* 2006). Por todo ello existe una clara necesidad de incorporar nuevos sistemas de tratamiento de residuos y sistemas de detección de la presencia de metales en el medio ambiente, para prevenir así la exposición de los sistemas vivos a estos contaminantes.

Tradicionalmente, el riesgo ambiental por contaminación de metales se determina

cuantificando el contenido total en metales de las diferentes muestras ambientales mediante técnicas analíticas físico-químicas (espectrometría de absorción atómica, cromatografía de intercambio iónico, etc.). Sin embargo, a pesar de su alta sensibilidad, los métodos convencionales presentan importantes desventajas. Requieren laboratorios especializados con instrumentos de alto coste y personal cualificado, además de la necesidad de un procesamiento previo de las muestras a analizar. Pero lo que es más importante es que los métodos analíticos proporcionan información sobre la naturaleza química de la muestra analizada, pero no sobre la biodisponibilidad de los metales presentes, factor éste de suma importancia ya que determina su toxicidad sobre los sistemas vivos. Las metodologías físico-químicas tampoco evalúan sus efectos sobre los seres vivos, ni analizan las posibles interacciones entre diferentes metales presentes en muestras complejas (Belkin 2003).

C.3 Biosensores moleculares y celulares para metales

Como respuesta a estas necesidades aparecieron los bioensayos y biosensores, en los que se emplean sistemas biológicos completos o moléculas biológicas para la detección y evaluación del efecto tóxico de contaminantes ambientales. En general, el término biosensor se refiere a cualquier sistema capaz de detectar la presencia de un sustrato mediante un componente biológico que proporciona una señal cuantificable (Gu *et al.* 2004). Como sistema de transducción de la señal se han empleado sistemas ópticos, acústicos y electrónicos (Verma y Singh 2005). La función de un biosensor depende de la especificidad de su componente biológico, cuya elección depende de un gran número de factores: especificidad, almacenamiento, estabilidad ambiental, sustancias que se pretendan detectar, etc.

Desde los años 90 se han desarrollado numerosos biosensores para la detección de diversos metales en el medio (Tabla 4), desde los que utilizan componentes biomoleculares (enzimas, anticuerpos, proteínas no enzimáticas o ADN), y constituyen los biosensores moleculares; hasta los basados en microorganismos completos (modificados o no) e incluso organismos pluricelulares como el nematodo *C. elegans* (Verma y Singh 2005), y son los denominados biosensores celulares.

Las ventajas de los biosensores moleculares son su alta especificidad, selectividad y corto tiempo de reacción. Pero son más difíciles de construir, más caros y su mayor o menor especificidad y sensibilidad dependen del tipo de molécula seleccionada para su construcción. Sin embargo, estos sistemas no proporcionan una visión global de la toxicidad de los metales. Parámetros tan importantes como la biodisponibilidad del metal, sus efectos citotóxicos y genotóxicos, y las posibles interacciones entre metales son mejor determinados mediante los biosensores celulares. En vista de la gran relevancia de estos parámetros, gran parte del trabajo en biosensores ambientales se ha dirigido hacia el desarrollo de los biosensores celulares que además son más fáciles de mantener en el laboratorio, y más económicos.

Componente biológico	Metales	Concentración mínima detectable	Sistema de Transducción de la señal	Referencia
Enzima¹				
Fosfatasa alcalina	Cd	2,67-10 µM	Amperímetro	(Verma y Singh 2005)
L-glicerol fosfatasa oxidasa	Cu	0,5 µM – 0,13 mM	Calorímetro	
Piruvato oxidasa	Zn	3 – 10 µM	Fibra óptica	
L-lactato deshidrogenada	Pb	0,2 – 50 µM	Potenciómetro	
Ureasa	Hg	0,02 µM – 0,04 mM		
Peroxidasa	Ag	0,02 – 0,2 µM		
Proteínas no enzimáticas				
SmtA:GST	Cd, Zn, Cu, Hg	10 ¹⁵ M	Condensador	(Corbisier et al. 1999)
Fitoquelatina sintética EC20	Cd, Cu, Zn, Pb, Hg	100 fM	Condensador	(Bontidean et al. 2003)
Anhidrasa carbónica humana II	Cu	0,1 pM	Fibra óptica	(Zeng et al. 2003)
Anticuerpos				
A. monoclonal anti-Cd (2A81G5)	Cd	0,06 µM	ELISA	(Khosraviani et al. 1998)
A. monoclonal (1SB4)	Co	10 nM	ELISA	(Blake et al. 2001)
ADN				
8-17 DNazyma	Pb	100 nM	Colorimétrico	(Liu y Lu 2003)
Célula completa²				
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cd	10 nM	Luminómetro	(Tauriainen et al. 1998)
	Pb	33 nM		
<i>Escherichia coli</i>	Cd	0,1 nM	Luminómetro	(Liao et al. 2006)
	Pb	10 nM		
	Sb	0,01 nM		
<i>E. coli</i>	Cu ó Cr	1 µM	Amperímetro	(Corbisier et al. 1999)
	Pb	0,5 µM		
<i>E. coli</i>	Hg	0,003 nM	Luminómetro	(Pepi et al. 2006)
<i>S. cerevisiae</i>	Cu	0,1 mM	Luminómetro	(Lehmann et al. 2000)

Tabla 4. Biosensores moleculares y celulares para metales pesados. ¹: A modo de resumen se indica el rango de concentraciones mínimas de cada metal que pueden ser detectadas mediante los biosensores moleculares enzimáticos, sin especificar la sensibilidad de cada biosensor para cada metal. Según la literatura científica, sólo los biosensores basados en la Fosfatasa alcalina (Zn), L-glicerol fosfatasa oxidasa (Hg), Piruvato oxidasa (Hg) y Peroxidasa (Hg) aparecen descritos como específicos para un solo metal. ²: A modo de ejemplo se indican algunos microorganismos modificados genéticamente para ser empleados como biosensores celulares de metales pesados. Para una descripción más detallada y mayor número de ejemplos de biosensores celulares para metales consultar Tablas 37 y 38 (apartado C.3.7 de D). Adaptado de Verma y Singh (2005).

Existen dos tipos básicos de biosensores celulares, dependiendo de que el gen reportero se exprese constitutivamente o sea inducible por la presencia del tóxico (Gu *et al.* 2004) (Figura 6). El constitutivo utiliza un promotor que se expresa con un elevado nivel basal en condiciones normales (ausencia del tóxico o agente estresante). Bajo la presencia del tóxico las condiciones de expresión basal se reducen, y el nivel de reducción se relaciona con el nivel de toxicidad general (Figura 6). Por el contrario, el biosensor celular basado en un sistema reportero inducible en ausencia del tóxico mantiene un bajo o nivel basal de expresión, y cuando aparece el tóxico se induce elevando la expresión del gen reportero (Figura 6).

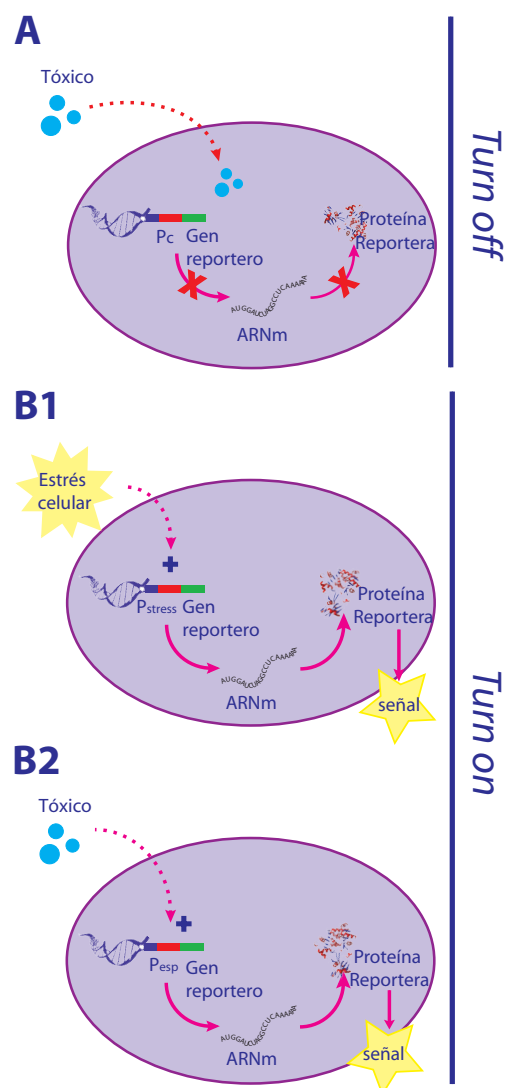
C.4 Tipos de bioensayos empleando biosensores celulares

Un biosensor celular utiliza la célula completa procariota o eucariota como sistema reportero, que incorpora el elemento sensor y el sistema de transducción de la señal. Existen dos tipos de bioensayos en los que se pueden usar biosensores celulares (Belkin 2003):

a) Bioensayos *turn off* o *lights off*. La toxicidad de una muestra es estimada a partir del grado de inhibición de una actividad celular (ej.: tasa respiratoria, crecimiento, movilidad, biosíntesis de una molécula específica, etc.). Se fundamentan en la medida del descenso de la señal (actividad celular) consecuencia de la presencia del elemento tóxico. Este tipo de bioensayos suele utilizar biosensores constitutivos (Figura 6).

La mayoría de estos bioensayos se utilizan para determinar el grado de toxicidad general de una muestra, es decir, cómo de tóxica es la muestra, en lugar de qué tipo de tóxicos están presentes en ella. Uno de los bioensayos de este tipo más conocidos que utiliza un biosensor constitutivo es el denominado *Microtox™* (Azure, Buks, Reino Unido), en el cual la toxicidad general de la muestra se determina según el grado de inhibición de la emisión de luz de la bacteria bioluminiscente *Vibrio fischeri*.

Figura 6. Tipos de bioensayos a realizar empleando biosensores celulares. **(A):** Bioensayo de tipo *turn off* utilizando un biosensor constitutivo. **(B):** Bioensayo de tipo *turn on* utilizando un biosensor inducible por estrés general celular **(B1)** o inducible por un tipo de tóxico específico **(B2)**. Pc: promotor constitutivo. Pstress: Promotor que responde a estrés celular. Pesp: Promotor que responde a un agente específico.



Igualmente, también se han desarrollado biosensores constitutivos para la detección de metales en este tipo de bioensayos. Lee y colaboradores desarrollaron un biosensor para la detección de Cr basado en la inhibición de bioluminiscencia de la bacteria *Photobacterium phosphoreum* MT10204 (Lee *et al.* 1992). Un ejemplo de bioensayo *turn off* utilizando un protozoo ciliado es aquel que utiliza un mutante de *T. thermophila* superproductor de melanina para la detección de micotoxinas (Martín-González *et al.* 1997).

b) Bioensayos *turn on* o *lights on*. En estos bioensayos se suele utilizar biosensores inducibles, los cuales a su vez pueden ser estrés-general (responden a muy diferentes tóxicos y/o agentes estresantes) o estrés-específicos (responden específica y exclusivamente a un tipo de tóxico o un grupo relacionado de tóxicos, como ciertos metales). En estos biosensores la producción de la molécula reportera está bajo el control de un promotor que es activado por la presencia del tóxico (como un metal). Aunque pueden emplear organismos no manipulados genéticamente, el procedimiento general consiste en fusionar un promotor inducible por metal u otro tóxico a un gen reportero. Esta construcción es introducida en la célula (en un plásmido multicopia o integrada en el genoma), de modo que cuando el metal o el tóxico correspondiente está presente se induce la expresión del gen reportero, produciéndose así una señal cuantificable (Figura 6).

Los sistemas reporteros más utilizados son la bioluminiscencia (catalizada por la enzima luciferasa bacteriana (genes *lux*) o de la luciérnaga (gen *lucFF*), fluorescencia (emitida por la proteína GFP y sus derivados), la producción de color debida a la enzima β -galactosidasa (gen *lacZ*), o actividad electroquímica (gen *phoA*).

Para la elección del elemento sensor, en el caso de metales se tienen en cuenta aquellos genes y proteínas que participan en los procesos de entrada y detoxificación de metales. Casi la totalidad de los biosensores celulares para la detección de metales desarrollados actualmente son bacterianos (Tabla 4). En general presentan una alta sensibilidad, con una duración del ensayo de entre 30-180 minutos.

Una de las mayores limitaciones de los biosensores celulares es la difusión de sustratos/productos (potenciales tóxicos) a través de la pared celular y la membrana citoplasmática, lo que resultaría en una respuesta más lenta a la presencia del tóxico en el medio, con respecto a los biosensores moleculares (D'Souza 2001). Para solucionar este problema las células pueden ser permeabilizadas mediante agentes físicos, químicos o enzimáticos. El inconveniente de este tratamiento de permeabilización es que hace que las células puedan perder su viabilidad a lo largo del tiempo.

Otra limitación de los biosensores celulares es la menor especificidad comparado con los biosensores moleculares. Mientras que algunos de los biosensores celulares se muestran como altamente específicos para un determinado metal, otros responden a un rango de metales más amplio (Tabla 4). En general, los biosensores celulares detectan grupos de compuestos tóxicos más que un único compuesto (van der Meer *et al.* 2004). No obstante, esto puede ser

útil cuando los compuestos de un mismo grupo tienen mecanismos de toxicidad o efectos de toxicidad similares (Belkin 1998), como es el caso de los metales (Figura 1).

C.5 Ventajas del uso de microorganismos como biosensores celulares para la evaluación de la contaminación ambiental

El uso de microorganismos como biosensores aporta información con relevancia biológica, ya que proporciona datos sobre los efectos biológicos debidos a la exposición del compuesto tóxico, y que se pueden extrapolar a organismos vivos más complejos. Los microorganismos presentan así mismo numerosas ventajas para ser usados como biosensores para evaluar la contaminación ambiental, ya que están presentes en todos los hábitats y son capaces de metabolizar una amplia variedad de compuestos químicos. Además tienen una gran capacidad de adaptarse a condiciones adversas y desarrollar mecanismos de adaptación (D'Souza 2001).

Gracias a su corto tiempo de división celular, se pueden obtener grandes poblaciones homogéneas en un corto intervalo de tiempo, y por tanto una respuesta amplificada para detectar el cambio producido por la presencia del compuesto tóxico (Gutiérrez *et al.* 2003). Además, su mantenimiento en el laboratorio es relativamente sencillo, asequible y barato. Igualmente, pueden ser fácilmente modificados por manipulación genética, adquiriendo nuevas características que permitan optimizar el biosensor en términos de sensibilidad y especificidad de respuesta. Mediante la manipulación genética es posible dirigir la respuesta del biosensor a un tipo de contaminante o una clase de contaminantes determinada, así como modificar o introducir nuevos genes reporteros más fáciles de cuantificar.

Su pequeño tamaño hace posible que sean buenos sistemas para la miniaturización, pudiendo servir además como biosensores para múltiples compuestos. Por ejemplo, diferentes biosensores con diferente especificidad de detección pero como la misma señal reportera, se pueden utilizar en paralelo para analizar rápidamente una variedad de contaminantes en distintas muestras ambientales, funcionando así como un "primer filtro" para compuestos de toxicidad general (van der Meer *et al.* 2004).

C.6 Ventajas del protozoo ciliado *Tetrahymena thermophila* como biosensor celular

El protozoo ciliado *T. thermophila* es un microorganismo eucariota modelo (Collins y Gorovsky 2005) cuyo estudio ha contribuido a descubrimientos fundamentales en la biología como el ARN catalítico (Zaug y Cech 1986), la estructura de los telómeros (Blackburn y Gall 1978; Yao y Yao 1981), y la identificación y el funcionamiento de la telomerasa (Greider y Blackburn 1985) entre otros.

T. thermophila es un miembro del *phylum* Ciliophora, que junto a los *phyla* Apicomplexa y Dinoflagellata, constituyen el supergrupo Alveolata. Como el resto de ciliados, cada célula de

Tetrahymena (40-50 μm de longitud y 20 μm de diámetro) contiene dos núcleos funcional y estructuralmente diferentes. El micronúcleo (MIC) (2n), con 5 pares de cromosomas, representa la línea germinal siendo sólo activo durante la conjugación, proceso durante el cual sufre mitosis y meiosis. Por el contrario, el macronúcleo (MAC) (45n), originado a partir del micronúcleo, es transcripcionalmente activo durante toda la vida de la célula, pero sus cromosomas no se reparten mitóticamente (sino amitóticamente), y por lo tanto, los genes macronucleares no experimentan segregación mendeliana.

T. thermophila cuenta, igualmente, con todas las ventajas anteriores propias de un microorganismo (apartado C.5) para ser usado como biosensor celular. Crece relativamente rápido hasta alcanzar elevadas densidades celulares ($\sim 10^6$ células/ml) en diversos medios de cultivo (incluyendo medio definido y axénico) y condiciones (medio líquido y sólido). Su genoma macronuclear está completamente secuenciado y es susceptible de análisis genético (obtención de mutantes recesivos, homocigotos totales a nivel micro- y macronuclear, cepas nulisómicas, etc.). Mediante las técnicas moleculares actuales (electroporación, transformación biolística, microinyección) se pueden obtener cepas transformantes (Asai y Forney 2000; Turkewitz *et al.* 2002) y cepas *knockout*. Y además las líneas celulares pueden ser conservadas indefinidamente en nitrógeno líquido.

Además de todas estas ventajas, *Tetrahymena*, al igual que el resto de protozoos ciliados, presenta una ventaja adicional. A diferencia de bacterias y levaduras, los ciliados no presentan pared celular en su estado vegetativo. Como se indicó en el apartado C.4, la pared celular puede dificultar la difusión al interior celular tanto de sustratos requeridos por la molécula reportera (por ejemplo: D-luciferina para aquellos biosensores basados en bioluminiscencia eucariota), como la difusión del compuesto tóxico que se pretende detectar. La ausencia de pared celular en ciliados hace que la difusión de estos sustratos y/o compuestos tóxicos al interior del biosensor celular sea más fácil y la respuesta celular probablemente más rápida (Gutiérrez *et al.* 2003). Además, evita la necesidad de un tratamiento químico o enzimático de permeabilización celular previa.

Por otro lado, tras la secuenciación completa del genoma macronuclear de *T. thermophila*, se ha comprobado que el ciliado comparte más genes ortólogos con humanos que aquellos que comparten humanos y levaduras entre sí (Eisen *et al.* 2006). Aunque esto no quiere decir que *T. thermophila* y humanos sean más similares entre sí que hongos y humanos, el alto número de ortólogos compartidos entre *H. sapiens* y *T. thermophila* refleja el gran número de genes que se han perdido en otros grupos eucariotas, pero que conservan *H. sapiens* y *T. thermophila*. De 874 genes humanos con ortólogos en *T. thermophila* pero no en *S. cerevisiae*, 58 de ellos corresponden a *loci* asociados con enfermedades humanas (Eisen *et al.* 2006). Por tanto, *T. thermophila* representa un excelente modelo (de biología animal) para el estudio de la biología celular eucariota superior (incluyendo la humana), y aplicable en ecotoxicología comparativa.

Todas estas ventajas convierten a *Tetrahymena* en un atractivo sistema celular para

ser utilizado en la evaluación de contaminación ambiental. De hecho, durante más de cuatro décadas ha sido el microorganismo elegido en bioensayos para determinar el efecto de carcinógenos, insecticidas, fungicidas, micotoxinas, compuestos orgánicos tóxicos, metales, anti-metabolitos y compuestos farmacéuticos (Nilsson 1989; Dayeh *et al.* 2005; Gallego *et al.* 2007). La base de datos TETRATOX (Schultz 1997a; 1997b) ha sido establecida como una colección de datos de toxicidad para más de 2.400 contaminantes industriales, no incluyendo metales. Sin embargo, hasta ahora existen tan sólo dos trabajos que hayan empleado este ciliado como biosensor celular, uno para la detección de micotoxinas (Martín-González *et al.* 1997), y otro como biosensor de condiciones de estrés celular general (Barchetta *et al.* 2005).

Objetivos

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se persiguen tres objetivos fundamentales, que a su vez se dividen en una serie de objetivos específicos o particulares.

A) Incrementar el conocimiento básico sobre los genes codificantes de MTs en especies del género *Tetrahymena* (protozoo ciliado):

1. Estudio comparativo de los tres genes codificantes de Cd-MTs del ciliado *T. thermophila* (*MTT1*, *MTT3* y *MTT5*), y análisis de su expresión en respuesta a diversos agentes estresantes, incluidos diferentes metales pesados.

2. Análisis *in silico* de la región promotora de estos genes, junto con el estudio de proteínas de unión a ADN en motivos conservados presentes en dicha región. Con la finalidad de iniciar la búsqueda de posibles factores de transcripción involucrados en la regulación de la expresión de estos genes.

3. Búsqueda de nuevos genes codificantes de MTs en el ciliado *T. rostrata*, caracterización y análisis de su expresión en respuesta a distintas condiciones de estrés ambiental. Análisis comparativo con los genes MT de *T. thermophila*.

B) Diseño y obtención de biosensores celulares basados en los genes MT de *T. thermophila*:

1. Obtención de cepas de *T. thermophila* que contengan distintos genes reporteros (*gfp* o *lucFF*) bajo el control de los promotores de los genes *MTT1* o *MTT5* de este ciliado.

2. Desarrollo de un biosensayo para la aplicación de estos biosensores celulares en la detección de metales pesados en muestras naturales.

3. Validación de los biosensores celulares construidos. Aplicación en muestras naturales con contaminación por metales conocida o desconocida.

C) Estudio de la existencia de otras moléculas queladoras de metales (fitoquelatinas) en *T. thermophila*, y su posible implicación en el mecanismo de bioacumulación de metales pesados en este ciliado:

1. Analizar la posible existencia del gen codificante para fitoquelatín sintasa en el genoma macronuclear de *T. thermophila*. Llevar a cabo su caracterización y el análisis de sus niveles de expresión bajo estrés por diferentes metales pesados.

2. Dilucidar la presencia de fitoquelatinas en *T. thermophila*.

Materiales y Métodos

MATERIALES

1 MATERIAL BIOLÓGICO

1.1 Especies del protozoo ciliado *Tetrahymena*

En este trabajo se utilizaron dos especies distintas del ciliado *Tetrahymena* (*Eukaryota*; *Alveolata*; *Ciliophora*; *Intramacronucleata*; *Oligohymenophorea*; *Hymenostomatida*; *Tetrahymenina*; *Tetrahymenidae*; *Tetrahymena*).

1.1.1 *Tetrahymena thermophila* Nanney and McCoy

En los experimentos llevados a cabo en este trabajo se han empleado diferentes cepas del ciliado modelo *T. thermophila*: SB1969, CU522, CU428 y B2086, cedidas amablemente por los profesores Dr. Eduardo Orias (*University of California*, Santa Bárbara, EEUU), Dr. Jack Gaertig (*University of Minnesota*, Minneapolis, EEUU) y Dr. Aaron Turkewitz (*The University of Chicago*, Chicago, Illinois, EEUU) respectivamente. Las características genotípicas y fenotípicas de cada cepa se indican en la Tabla 5.

1.1.2 *T. rostrata* (Kahl) Corliss

La especie *T. rostrata* cepa ID-3 (ATCC-30770™) fue adquirida a través de la colección americana de cultivos tipo (ATCC). Esta especie presenta genotipo y fenotipo silvestre, no presentando así ninguna característica génica destacable.

Cepa	Genotipo micronuclear	Genotipo macronuclear	Fenotipo Macronuclear	Tipo conjugante	Fuente
SB1969	<i>chx1-1/chx1-1 mpr1/mpr1</i>	tipo silvestre	pm-S, cycl-S	II	E. Orias
CU522	<i>mpr1/mpr1, btu1-1/btu1-1</i>	<i>mpr1, btu1-1</i>	mp-R, pac-S	VI	J. Gaertig
CU428.1	<i>mpr1-1/mpr1-1</i>	tipo silvestre	pm-S, mp-S	VII	A. Turkewitz
B2086	<i>mpr1-1/mpr1-1</i>	tipo silvestre	pm-S, mp-S	II	A. Turkewitz

Tabla 5. Características genotípicas y fenotípicas de las distintas cepas del ciliado modelo *T. thermophila* empleadas en este trabajo. A nivel micronuclear: *chx1-1*: gen que confiere resistencia a la cicloheximida. *mpr1*: gen de resistencia a 6-metilpurina. *mpr1-1*: alelo mutante que confiere resistencia a la 6-metilpurina. *btu1-1*: alelo mutante del gen *BTU1* (K350M) que confiere hipersensibilidad a paclitaxel. A nivel macronuclear: cycl-S: sensible a la cicloheximida. mp-R: resistencia a la 6-metilpurina. mp-S: sensibilidad a 6-metilpurina. pac-S: sensibilidad a paclitaxel. pm-S: sensibilidad a paramomicina. En números romanos se indica el tipo conjugante de cada cepa.

1.2 *Escherichia coli*

La estirpe bacteriana *Escherichia coli* TOPO 10 (Invitrogen), [*F mcrA Δ(mrr hsdRMS mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rps L (Str^R) endA1 nupG*] fue utilizada para la clonación de las construcciones génicas obtenidas en este trabajo. Esta cepa no expresa el represor *lac*.

1.3 Mantenimiento de cepas

1.3.1 Mantenimiento y conservación de cepas de *E. coli*

Las distintas bacterias recombinantes obtenidas en este trabajo fueron conservadas a corto plazo (2-3 semanas) a 4 °C, crecidas en placas de LB conteniendo el antibiótico frente al cual el vector de transformación confiere resistencia. En cambio, las cepas fueron conservadas a largo plazo congeladas a -80 °C, en medio LB líquido conteniendo el antibiótico y una solución crioprotectora al 25 % (CaCl₂ 100 mM y glicerol al 15%).

1.3.2 Mantenimiento y conservación de cepas de *Tetrahymena*

Las distintas líneas clonales de las cepas recombinantes obtenidas en este trabajo, así como el resto de cepas de las diferentes especies de *Tetrahymena* utilizadas, fueron mantenidas a corto plazo (1-3 meses) en medio SOJA (Tabla 6) a 28°C y en condiciones de baja concentración de oxígeno.

Además todas las cepas fueron conservadas a largo plazo congeladas en N₂ líquido. Para ello, los cultivos en fase exponencial de crecimiento fueron sometidos a un proceso de inanición en tampón Tris-HCl 0,01 M pH 7,5 durante 3 días. Posteriormente las células fueron

recogidas mediante centrifugación a 1.100 g durante 3 minutos, y fueron resuspendidas en una solución crioprotectora de DMSO al 10 % en tampón Tris-HCl 0,01 M pH 7,5. La suspensión celular ($\sim 1 \times 10^5$ células/ml) fue incubada en esta solución a temperatura ambiente durante 30 minutos, transferida a -80°C durante 4 horas, y finalmente almacenada en un contenedor especial de N_2 líquido.

2 MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo empleados para el crecimiento y mantenimiento de los distintos microorganismos utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla 6.

3 SOLUCIONES Y TAMPONES

La composición y utilidad de los diferentes tampones y soluciones empleados en este trabajo se detalla en la Tabla 7.

Medio de cultivo	Composición	Aplicación
Luria Bertani (LB) (Pronadisa)	Tripton 10 g/l Extracto de levadura 5 g/l NaCl 5 g/l Agar bacteriológico 15 g/l (para LB agar)	Cultivo de <i>E. coli</i>
SOC (Invitrogen)	Tripton 2 % Extracto de levadura 0,5 % NaCl 10 mM KCl 2,5 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 10 mM Glucosa 20 mM	Cultivo de <i>E. coli</i> TOPO 10 inmediatamente después de la transformación
PP210	Proteosa petona 2 % (Difco) suplementado con: FeCl ₃ 10 μM (Sigma) Estreptomicina /Penicilina G 250 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma) Anfotericina B 0,250 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma)	Cultivo de las distintas especies y cepas de <i>Tetrahymena</i>
SPP	Proteosa petona 2 % (Difco) Extracto de levadura 0,1 % (Difco) Glucosa 0,2 % (Sigma) Fe-EDTA 0,003 % (Sigma)	
SPPA	Proteosa petona 2 % (Difco) Extracto de levadura 0,1 % (Difco) Glucosa 0,2 % (Sigma) Fe-EDTA 0,003 % (Sigma) suplementado con: Estreptomicina /Penicilina G 250 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma) Anfotericina B 0,250 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma)	
SOJA	H ₂ O bidestilada estéril 1 semilla de <i>Glycine max</i> (soja)	Mantenimiento de cepas de <i>Tetrahymena</i> a medio plazo

Tabla 6. Medios de cultivo empleados para el crecimiento y mantenimiento de los microorganismos utilizados en este trabajo.

Solución	Composición	Aplicación
Reactivo de Bradford	Azul Coomassie G-250 0,05 % (BioRad) Ácido fosfórico 42,5 % (Panreac)	Método Bradford
Solución de bloqueo 10x (Roche)	<i>Blocking reagent</i> 10 % en tampon maleico.	Bloqueo de uniones inespecíficas a la membrana
Solución crioprotectora de Glicerol	CaCl ₂ 100 mM (Panreac) Glicerol al 15% (Panreac)	Solución crioprotectora para mantener clones de <i>E. coli</i> congelados a -80 °C
Solución crioprotectora de DMSO	Tampón Tris HCl 0,01 M pH 7,5 DMSO 10 % (Merck)	Solución crioprotectora para mantener cepas de <i>Tetrahymena</i> congeladas en N ₂ líquido
Solución de Desnaturalización	NaCl 1,5 M (Panreac) NaOH 0,5 M (Panreac)	Desnaturalización de ADN en geles de agarosa
Solución de Neutralización	Tris HCl 0,5 M pH 7,2 NaCl 1 M ((Panreac)	Neutralización de geles de agarosa previa a la transferencia a nylon ⁺
Tampón	Composición	Aplicación
Tampón BamHI 10x (Fermentas)	Tris HCl 10 mM pH 8,0 MgCl ₂ 5 mM, KCl 100 mM Triton X-100 0,02% 1 mM 2-mercapthoethanol BSA 0,1 mg/ml	Digestión de ADN con la endonucleasa BamHI
Tampón de carga 5x para electroforesis de ADN en geles de poliacrilamida	Tampón Tris-HCl 300 mM pH 7,5 Glicerol 50 % (Panreac) Azul de bromofenol 0,05 % (BioRad) Xileno cianol FF 0,05 % (BioRad)	Tampón de carga de electroforesis de ADN en geles de poliacrilamida en ensayos EMSA
Tampón de carga 5x para electroforesis de ARN	Glicerol 20 % (Panreac) EDTA 4 mM pH 8 (BM) Formaldehído 8,9 M (Merck) Formamida 30 % (Merck) Tampón FA 2x Azul de Bromofenol (BioRad) (saturación)	Tampón de carga de muestras de ARN
Tampón de detección	Tampón Tris HCl 0,1 M pH 9,5 NaCl 0,1 M (Panreac)	Tampón de fosfatasa alcalina
Tampón de DNasa 10x (Ambion)	Tampón Tris 100 mM, MgCl ₂ 25 mM, CaCl ₂ 1 mM	Incubación enzima DNasa (Ambion)
Tampón de electroporación	Hepes 10 mM pH 7,5 (Sigma)	Tampón de electroporación
Tampón de electrotransferencia	Tris 0,25 M (Amresco) Glicina 1,92 M (Sigma) Metanol 20 % (Merk)	Tampón de electrotransferencia de proteínas a membrana PVDF.
Tampón de extracción	Tampón Tris HCl 50 mM pH 8 NaCl 0,5 M (Panreac) Glicerol 10 % (Panreac) DTT 1mM (Merck) PMSF 1mM (Sigma) EDTA 0,1 mM (BM)	Extracción de proteínas nucleares
Tampón FA 10 x	MOPS 200 M (Roche) Acetato sódico 50 mM (Panreac) EDTA 10 mM (BM) Ajustado a pH 7 con NaOH	Tampón de electroforesis de ARN en condiciones desnaturalizantes
Tampón de lavado de membranas (Roche)	Ácido maleico 0,1 M pH 7,5 NaCl 0,15 M Tween 20 0,3 %	Lavado de membranas de nylon ⁺ o PVDF

Tabla 7. Soluciones y tampones utilizados.

Tampón	Composición	Aplicación
Tampón de lisis de <i>Tetrahymena</i>	Tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,5 MgCl ₂ 10 mM (Sigma) Sacarosa 250 mM (Panreac) Triton X-100 0,5 % (Merk)	Ruptura de membrana citoplasmática
Tampón de unión ADN-proteína (<i>binding buffer</i>)	Tampón Tris-HCl 10mM pH 7,5 NaCl 50 mM (Panreac) MgCl ₂ 2,5 mM (Sigma) Glicerol 4 % (Panreac) DTT 0,5 mM (Merk) (en H ₂ O Milli Q)	Unión de proteínas a ADN en ensayos EMSA
Tampón Cacodilato	Cacodilato sódico 200 mM pH 7,2	Preparación soluciones para microscopía electrónica
Tampón CCLR (Promega)	Composición desconocida	Tampón de lisis celular
Tampón <i>DIG Easy Hyb</i> (Roche)	Composición desconocida	Hibridación de fragmentos de ADN con sondas ADN-DIG
Tampón Dryl (Dryl 1959)	Citrato de sodio 2 mM (Panreac) NaH ₂ PO ₄ 1 mM (Panreac) NaHPO ₄ 1 mM (Panreac) CaCl ₂ 1,5 mM (Panreac)	Tratamiento de inanición
Tampón DMC	Dilución 1/10 de tampón Dryl suplementado con: MgCl ₂ 0,1 mM (Panreac) CaCl ₂ 0,5 mM (Panreac)	Lavado de células e inducción del proceso de conjugación en <i>T. thermophila</i>
Tampón EB (Qiagen)	Tris HCl, pH 8.5 10 mM	Elución de ADN purificado en columnas de fibra de vidrio
Tampón G 10 x (Fermentas)	Tampón Tris-HCl 10 mM pH 7.5 MgCl ₂ 10 mM NaCl 50 mM BSA 0,1 mg/ml	Digestión de ADN con las endonucleasas <i>ApaI</i> y <i>XhoI</i> (Fermentas)
Tampón H 10x (Takara)	Tampón Tris HCl 500mM pH 7,5 MgCl ₂ 100 mM DTT 10 mM 500 mM NaCl	Digestión de ADN con la endonucleasa <i>EcoRI</i> (Takara)
Tampón Hepes 10 mM pH 7,5	Hepes 10 mM (Sigma) Ajustado a pH 7,5 con NaOH	Tampón de electroporación
Tampón Hepes 50 mM pH 7	Hepes 50 mM (Sigma) Ajustado a pH 7,5 con NaOH	Lavado de células
Tampón Maleico pH 7,5 (Roche)	Ácido maleico 0,1 M NaCl 0.15 M	Dilución de solución de bloqueo
Tampón NDS 1x	TrisHCl 10 mM pH 8 (Amresco) EDTA 0,5 mM (BM) SDS 1% (Panreac)	Tampón de lisis celular para aislamiento de ADN genómico de <i>Tetrahymena</i>
Tampón NEB1 (NEB)	BisTris-Propano-HCl 10 mM pH 7.0 MgCl ₂ 10 mM, DTT 1 mM	Digestión de ADN con las endonucleasas <i>KpnI</i> y <i>SacI</i> (NEB)
Tampón RTL 1x (Qiagen)	Composición desconocida	Tampón de lisis celular para aislamiento de ARN total
Tampón SSC 20x (Pronadisa)	NaCl 3 M Citrato de sodio 0,3 M pH 7,0.	Tampón de transferencia de ADN de geles de agarosa a membrana de nylon ⁺
Tampón SSC 2x / 0,1 % SDS	Tampón SSC 2x SDS 0,1 % (Panreac)	Lavado de nylon ⁺
Tampón SSC 0,5x / 0,1 % SDS	Tampón SSC 0,5x SDS 0,1 % (Panreac)	Lavado de nylon ⁺
Tampón TAE 50x (National Diagnostics)	Tris Acetato 2 M Na ₂ EDTA 100 mM	Tampón de electroforesis de ADN en geles de agarosa

Tabla 7. (continuación) Soluciones y tampones utilizados.

Tampón	Composición	Aplicación
Tampón TBE 10x (Pronadisa)	Tris base 0,5 mM H ₂ BO ₃ 0,89 M Na ₂ EDTA 20 mM	Tampón de electroforesis de ADN en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes
Tampón TE	Tris 10 mM (Amresco) EDTA 1 Mm pH 7,5 (BM)	Resuspender ADN
Tampón TEN	Tampón Tris HCl pH 8 EDTA pH 8 1 mM (BM) NaCl 50 mM (Panreac)	Alineamiento de fragmentos de ADN empleados en EMSA
Tampón TNED	Tampón Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 50 Mm (Panreac) EDTA 0,1 mM (BM) DTT 1mM (Merk)	Renaturalización de las proteínas unidas a la membrana PVDF en Southwestern blotting
Tampón Tris Glicina 10x (National Diagnostics)	Tris base 0,25 M Glicina 1,92 M	Electrotransferencia de proteínas
Tampón Tris Glicina SDS 10x (National Diagnostics)	Tris base 0,25 M Glicina 1,92 M SDS 1 %	Tampón de electroforesis de proteínas SDS-PAGE
Tampón Tris Glicina Metanol	Tampón Tris Glicina 1x (ND) Metanol 20 % (Merk)	Electrotransferencia de proteínas
Tampón Tris-HCl 0,1 M pH 6,8	Tris base 0,1 M (Amresco) Ajustado a pH 6,8 con HCl.	Lavado de células
Tampón Tris-HCl 0,1 M pH 7,5	Tris base 0,1 M (Amresco) Ajustado a pH 7,5 con HCl.	Lavado de células
Tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8 EDTA 5 mM	Tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8 EDTA 5 mM	Lavado de células

Tabla 7. (continuación) Soluciones y tampones utilizados.

MÉTODOS

4 TRATAMIENTOS CON AGENTES ESTRESANTES

Para los estudios realizados en este trabajo, las diferentes cepas de *Tetrahymena* empleadas fueron sometidas a diferentes condiciones de estrés, como se refleja en la Tabla 8.

Para los estudios de análisis de expresión génica, se empleó cada metal a una concentración de aproximadamente la mitad de su CL₅₀, que produce una escasa mortalidad celular. El metal se adicionó al cultivo en forma de sal metálica disuelta en el medio PP210, a una concentración tal que se alcanzase la concentración final del metal deseada (Tabla 9). Este mismo procedimiento se siguió para los tratamientos con paraquat (PQ).

Sin embargo, para el resto de los estudios se empleó un amplio rango de concentraciones metálicas de acuerdo con la finalidad de cada experimento. En este caso, el metal se adicionó al cultivo en forma de sal metálica disuelta en el mismo medio donde se realizase el tratamiento (PP210 o tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8), a una concentración tal que se alcanzase la concentración final deseada del metal (Tabla 9).

Agente estresante	Procedimiento	Tiempo de exposición (horas)
Metal pesado	Cultivo celular al que se adiciona la sal metálica correspondiente a una concentración final determinada	1, 2, 24 y 96
Choque térmico	Cultivo celular sometido a un choque térmico de 4 ó 42 °C	2
pH	Cultivo celular transferido a medio de cultivo con pH ácido (pH 5) o básico (pH 9)	24
Estrés oxidativo	Cultivo celular al que se añade paraquat a una concentración final de $7,78 \times 10^{-9}$ M	24
Inanición	Cultivo celular transferido a tampón Dryl.	24 y 96

Tabla 8 Condiciones de estrés a las que fueron sometidas las cepas y/o especies de *Tetrahymena* empleadas en este trabajo.

Ensayo	Metal pesado	Sal metálica empleada	Concentración del átomo metálico (M)	Condiciones de exposición (medio y T°)	Tiempo de exposición (horas)
Análisis de la expresión génica	Cd	CdCl ₂	$4,45 \times 10^{-5}$	PP210 30 °C	1 y 24
	Cu	Cu SO ₄ ·5H ₂ O	$3,15 \times 10^{-4}$		1 y 24
	Zn	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	$3,82 \times 10^{-3}$		1 y 24
	Ni	NiCl ₂ ·6H ₂ O	$1,70 \times 10^{-3}$		1 y 24
	Pb	Pb(NO ₃) ₂	$9,65 \times 10^{-4}$		1 y 24
	As	NaHAsO ₄ ·7H ₂ O	$1,00 \times 10^{-4}$		1 y 24
Análisis del motivo MTCM1	Cd	CdCl ₂	9×10^{-7}		2
Análisis por microscopía electrónica	Cd	CdCl ₂	8×10^{-6} 9×10^{-7}	TrisHCl 0,01 M pH 6,8	2 y 24
Expresión de la GFP	Cd	CdCl ₂	9×10^{-7}	30 °C	2 y 24
Expresión de Luciferasa	Cd	CdCl ₂			2
	Cu	Cu SO ₄ ·5H ₂ O			2
	Zn	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	5×10^{-9}		2
	Pb	Pb(NO ₃) ₂	a		2
	As	NaHAsO ₄ ·7H ₂ O	5×10^{-4}		2
	Hg	HgCl ₂			2
Análisis de la presencia de FQs	Cd	CdCl ₂	$2,67 \times 10^{-5}$	PP210 30 °C	24 y 96

Tabla 9. Condiciones empleadas en los diferentes tratamientos con metales pesados.

5 AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

5.1 Aislamiento de ADN total

Para el aislamiento de ADN total, los cultivos de *Tetrahymena* en fase exponencial tardía de crecimiento ($\sim 1-3 \times 10^5$ cel/ml) fueron centrifugados a 500 g durante 3 minutos. Después de la retirada del medio de cultivo, las células fueron lavadas con tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8 con el fin de eliminar restos del medio de cultivo. Tras la centrifugación las células fueron inmediatamente resuspendidas en 500 μ l de tampón NDS (Tabla 7) conteniendo 2 mg/ml de Proteinasa K (Sigma). Tras una incubación de 24-48 horas a 37 °C se procedió a la extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25/24/1) (Merk) seguida de extracción con cloroformo/alcohol isoamílico (24/1), según el protocolo indicado en Hamilton y Orias (2000). Finalmente el ADN fue precipitado añadiendo dos volúmenes de etanol absoluto (Merk) y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M (Panreac), lavado con etanol al 70 % y 100 % y resuspendido en H₂O Milli Q (Millipore). En los casos en que no se requería un ADN de elevada pureza pero sí mayor rapidez en el proceso de extracción, se siguió el protocolo de Martín-Platero *et al.* (2007).

Para eliminar la posible contaminación del ADN total con restos de ARN, todas las muestras fueron tratadas con 5 μ g/ml RNasa libre de DNasa (Roche) a 37 °C durante 2 horas. Finalmente, el ADN se conservó disuelto en H₂O Milli Q (Millipore) congelado a -20 °C hasta su utilización.

La concentración del ADN extraído se determinó a partir de la medida de absorbancia a 260 nm, mediante la ecuación $[\text{ADN}] (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times D \times 50 \mu\text{g/ml}$, donde D es el factor de dilución empleado. Igualmente, el grado de pureza se estimó espectrofotométricamente como el cociente entre las absorbancias a 260 y 280 nm, obteniéndose valores dentro del intervalo 1,8-2,1. El nivel de integridad del ADN se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % en tampón TAE 1x (apartado 7.1, R). El ADN genómico total (micronuclear y macronuclear) de los ciliados *T. thermophila* y *T. rostrata* se detecta como una única banda en el límite superior de resolución electroforética (Figura 7).

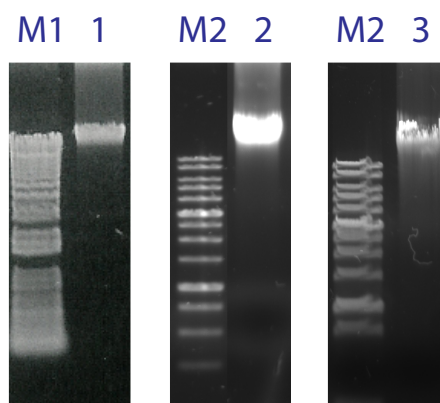


Figura 7. Aislamiento de ADN total de diferentes cepas y/o especies de *Tetrahymena*. Carril 1: *T. thermophila* cepa SB1969. Carril 2: *T. thermophila* cepa CU522. Carril 3: *T. rostrata* cepa ID-3. M1: marcador de tamaño molecular M-II (rango 0,12 – 23,1 kbp) (Roche). M2: marcador M-VI (0,15 – 2,1 kbp) (Roche).

5.2 Aislamiento de ARN total

Para el aislamiento de ARN total, los cultivos de *Tetrahymena* ($\sim 1-3 \times 10^5$ cel/ml) fueron centrifugados a 500 g durante 3 minutos. El sedimento celular fue lavado en tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8 e inmediatamente resuspendido en el tampón de lisis RTL (Qiagen) (Tabla 7) conteniendo 1% de β -mercaptoetanol (Bio-Rad), continuando así con el protocolo de extracción suministrado en el kit comercial *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). Tanto el material como las soluciones empleadas para el aislamiento de ARN, fueron tratados con dietil pirocarbonato (DEPC) (Sigma) al 0,1% (v/v) en H₂O bidestilada durante 24 horas a 37 °C, con el fin de inactivar las RNasas presentes en el medio.

Para eliminar la posible contaminación con ADN celular, todas las muestras fueron tratadas con DNasa I libre de RNasa (Ambion). Para ello, se incubaron 1-20 μ g de ARN total con 10 unidades de la DNasa en presencia del tampón de la enzima (Tabla 7) durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente se inactivó la enzima añadiendo 0,1% (v/v) del reactivo de inactivación suministrado por el kit, y el ARN total se conservó en agua libre de RNasas congelado a -80°C hasta su utilización.

La concentración del ARN se determinó a partir de la medida de absorbancia a 260 nm, mediante la ecuación $[\text{ARN}] (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times D \times 40$ $\mu\text{g/ml}$, donde D es el factor de dilución empleado. El grado de pureza se estimó como el cociente entre las absorbancias a 260 y 280 nm, obteniéndose valores dentro del intervalo 1,8-2,1. El grado de integridad se determinó mediante electroforesis de ARN en geles desnaturalizantes de agarosa al 1,2 % (apartado 2.2.4.2), empleando como referencia la integridad de las bandas correspondientes a los ARNs ribosómicos (Figura 8), mucho más abundantes que el resto de poblaciones de ARNs.

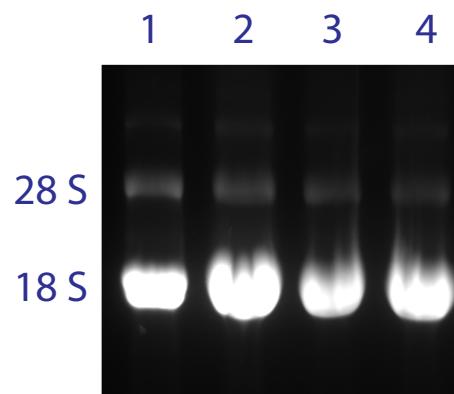


Figura 8. Ejemplos de ARN total aislado y purificado a partir de distintos cultivos (carriles 1-4) de *T. thermophila* expuestos a diferentes condiciones de estrés.

5.3 Aislamiento de ADN plasmídico (*miniprep*)

Para el aislamiento de ADN plasmídico se empleó el kit comercial *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen), siguiendo el protocolo recomendado para células animales. Este kit se basa en la lisis celular mediante NaOH y posterior precipitación del ADN cromosómico junto con los restos celulares. El ADN plasmídico, presente en el sobrenadante, se pasa a través de una columna de fibra de vidrio donde queda retenido. Tras varios pasos de lavado, el ADN plasmídico es eluido en un tampón con baja concentración de sales y se conserva a -20 °C hasta su utilización.

5.4 Extracción de bandas de ADN de geles de agarosa

Las bandas seleccionadas fueron cortadas con una cuchilla estéril bajo iluminación con luz UV. Para la extracción de los fragmentos de ADN de los geles de agarosa se empleó el kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen), siguiendo el protocolo suministrado por la casa comercial. Tras fundir la agarosa a 50 °C en el tampón suministrado, se añadió a esta mezcla isopropanol 100 % (Merk) en relación 3:1 (muestra/isopropanol) y se pasó a través de una columna de fibra de vidrio que retiene fragmentos de ADN escindidos. Tras varios pasos de lavado, el ADN fue eluido en el tampón EB suministrado (Tabla 7). En aquellos casos en que se pretendía recuperar una mayor cantidad de fragmentos de ADN de gran tamaño (>2-3 kb), se empleó tampón EB precalentado a 70 °C para la elución. El ADN aislado se conservó a -20 °C hasta su utilización.

6 AMPLIFICACIÓN GÉNICA POR PCR

6.1 Cebadores utilizados

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo fueron sintetizados por las casas comerciales Invitrogen e IDT, y purificados mediante cromatografía en fase reversa por la casa comercial correspondiente. Su secuencia y características se detallan en las Tablas 10 y 11.

6.2 PCR estándar

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el termocilador *Mastercycler gradient* (Eppendorf), en tubos eppendorf de 0,2 ml. El volumen total de cada reacción fue de 50 µl conteniendo: tampón de amplificación 1x (Applied Biosystems), MgCl₂ 2,5 mM (Applied Biosystems), 0,2 mM de los distintos dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Applied Biosystems), 0,2 µM de los diferentes cebadores, 1,25 unidades de la enzima Taq ADN polimerasa *AmpliTaq goldTM* (Applied Biosystems), y 100 ng de ADN molde. En cambio, para amplificar fragmentos de ADN de gran longitud (>2kb) se empleó la enzima *KOD XL DNA Polymerase* (Novagen), debido a su mayor capacidad de amplificación. En este caso cada reacción contenía en un volumen total de 50 µl: tampón de amplificación 1x (Novagen), 200 µM de los distintos dNTPs (Novagen), 0,2 µM de los diferentes cebadores, 2,5 unidades de la enzima *KOD XL DNA Polymerase* (Novagen) y 100 ng del ADN molde. Las condiciones de PCR estándar aplicadas para cada una de las ADN polimerasas empleadas en este trabajo se muestran en las Tablas 16 y 17.

Cebador	Secuencia (5' → 3')	% (G+C)	T _m (°C) (50 mM Na ⁺)	Aplicación
MTT5A	ATGGATAAAATTTCTGGTGAAAG	30	50	Amplificación ORF <i>TheMTT5</i>
MTT5B	TCAGCAACTACCTCCAGGC	60	59	
FQSN1	ATGTCGTTCACTATTCAA	35	49	Amplificación ORF <i>TtΨPCS</i>
FQSN3	GAAAAAGCCTAAAAACAATA	25	45	
FQSI	ATGTCGTTCACTATTCAAGA	36	52	
FQS2	TCAACTTTAAAAAGATTAT	15	41	
MET1	AAYTGYTGYTGYGGWGARAAY	42	49	Amplificación ORF <i>TrosMTT1</i>
MET2	TCRGTTCARCARCARGCYTTRGCY	54	53	
MTCU1	ATGGAYACTCAAACTCAAAC	37	49	Amplificación ORF <i>TrosMTT2</i>
MTCU2	TTACAGTTGGAAAGTAGAAC	40	49	
MTT5CDSA ¹	CATCTCGAGATGGATAAAATTTCTGGTGAAAGC	39	60	Amplificación ORF <i>TheMTT5</i>
MTT5CDSB ¹	CTGGGGCCCTCAGCAACTACCTCCAGG	66	68	
MTT1CDSA ¹	CATCTCGAGATGGATAAAAGTTAATAGCTGTTC	39	60	Amplificación ORF <i>TheMTT1</i>
MTT1CDSB ¹	CTGGGGCCCTCATTTACAACATTAAACAAGTCTA	42	62	
MTT1UTRA	ATAGGATCCCCAATAAAATAATAGCAATGACTATAC	29	56	Amplificación de la región 5' UTR de <i>TheMTT1</i>
MTT1UTRB	ATGAAGCTTGCCATTATTTAAGTTAGTATTATTATTATTATTAG	18	57	
MTT5UTRA ²	ATAGGATCCGATTAAAAATGGAGATCTTTATGAG	33	57	Amplificación de la región 5' UTR de <i>TheMTT5</i>
MTT5UTRB ²	ATGAAGCTTGCCATATTTTAACTGTGATATATTATATTGATTAT	20	57	
5 UTRBTU	TGAGAGATATAGTAATGC	33	42	Análisis genómico mediante PCR estándar de los transformantes de <i>T. thermophila</i> obtenidos en este trabajo
3 UTRBTUA	TCGGTCAGCTAAACCAAC	50	52	
3 UTRBTUB	ATGCGGGTGAGTGCAGAA	55	57	
PBTR ^{ev}	TCTTCCAGCGGATAGAAATGGCGC	56	62	
PBT ^{fw}	GAGGTAGAGCTAAATAGAGAGATATAGTAATGC	36	57	
MET1	AAYTGYTGYTGYGGWGARAAY	42	49	
MTT1TRB	CATTTACAAAGCATCACCAGTA	38	51	RACE
MTCU3	ATGTGTTCTTCTAC	41	32	

Tabla 10. Secuencia de los cebadores empleados en reacciones de PCR estándar y RACE. R=A o G; W=A o T; Y=C o T. Se muestra la temperatura de fusión teórica (T_m) para cada cebador.¹ Cada cebador presenta en su extremo 5' la diana de la enzima de restricción *Xho*I (CTCGAG) o *Ap*I (GGGCC'C), permitiendo así que el producto amplificado por PCR pueda ser insertado en el vector de expresión pVGF.MTT (apartado 8.3.2, MYM).² Cada cebador presenta en su extremo 5' la diana de la enzima de restricción *Bam*HI (G'GATCC) o *Hind*III (A'GATCT), permitiendo así que el producto amplificado por PCR sea incluido en el vector pBt(-7)Luc (apartado 8.3.2, MYM)

Cebador	Secuencia (5' → 3')	% (G+C)	T _m (°C)	Ampl (pb)	T _m Ampl (°C)
ATUBQ1	TGTCGTCCCCAAGGAT	56	52	54	73
ATUBQ2	GTTCTCTTGGTCTTGATGGT	45	52		
MTT1QA	TGTAAATGCTAAGCCA	37	44	193	79
MTT1QB	AAAGCAGCAGGGTTTAG	47	49		
MTT3QA	ACAATGTAATTGTGCTT	29	44	157	75
MTT3QB	TAAGCAGCTGGATTGTA	41	48		
MTT5QA	TGTGTCGGTTCAGGAGAAGGA	52	58	78	74
MTT5QB	AGGTCCGCATTTACATTCAGCTT	43	58		
FQSQA	TATTAGAGGAAAAGAGTGAAGTAGGA	34	53	68	71
FQSQB	AGCGATCAATGGAGCATA	44	51		
MTT1TRQA	TGTTGCAAGCCTGACACTA	47	54	56	70
MTT1TRQB	CATTTACAAGCATCACCAGTA	38	51		
MTT2TRQA	AATGCGGTGTTTCTGATG	44	51	52	71
MTT2TRQB	CAATCAGCACATTTGCAA	38	50		
GFPQA	CTACCCGAGCACCCAGTC	66	57	80	75
GFPQB	ACGAAGTCCAGCAGGAC	58	54		
LucQA	TCAAGTAACAACCGCGA	47	51	61	74
LucQB	TTTCGGTACTTCGTCCAC	50	52		
APIIQA	AAGCTCTAAAGCTAGTGCAA	40	52	63	69
APIIQB	CATTTATGCTGATTTCGATTT	30	47		
APIIIQA	TTGCATTTTGGTGATGTC	38	49	76	69
APIIIQB	GCTCAAGAAAGCATTACC	42	50		
APIIIQA	TGGAGCAACTGGAAGAAT	44	51	67	69
APIIIQB	GAACGATTATACATGTGCTTA	31	49		

Tabla 11. Secuencias de los cebadores empleados en las distintas reacciones de RT-PCR cuantitativa realizadas en este trabajo. Se muestran la temperatura de fusión teórica (T_m) de cada cebador, así como la T_m y longitud (pb) del fragmento que amplifica cada pareja empleada.

Etapas de amplificación	Nº ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desnaturalización inicial	1	95	7
Desnaturalización	30	95	1
Reasociación		50	1
Polimerización		72	2
Extensión final	1	72	5

Tabla 12. Condiciones y etapas de amplificación mediante PCR estándar empleando la enzima *AmpliTaq* ADN polimerasa. La temperatura óptima de reasociación (T_m) para todos los cebadores empleados en este trabajo se fijó en 50 °C.

Etapas de amplificación	Nº ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desnaturalización	30	95	5 x 10 ⁻¹
Reasociación		T _m – 5 °C	8 x 10 ⁻²
Polimerización		74 °C	1 / 1kb
Extensión final	1	74	10

Tabla 13. Condiciones y etapas de amplificación mediante PCR estándar empleando la enzima *KOD XL* ADN polimerasa. La temperatura óptima de reasociación (T_m) para todos los cebadores empleados en este trabajo se fijó en 50 °C.

6.3 RT-PCR

La síntesis de la primera cadena de ADNc a partir de ARNm se realizó según el protocolo suministrado en el kit *1st Strand cDNA Synthesis kit for RT-PCR* (AMV) (Roche). Para ello se empleó el cebador poli(dT)₁₅ en un volumen de reacción de 20 µl que contenía: tampón de reacción 1x, MgCl₂ 5 mM, dNTPs 1mM, 1,6 µg del cebador poli(dT)₁₅, 50 unidades de inhibidor de RNAsas, 20 unidades de la retrotranscriptasa RT AMV, y 5 µg de ARN. Posteriormente el ADNc sintetizado fue amplificado por PCR empleando los cebadores específicos de la secuencia de interés, y aplicando las condiciones de PCR estándar descritas en el apartado anterior. La cantidad (µg) de ARN total empleada para cada reacción fue presumiblemente la misma, con el fin de comparar distintas muestras control y tratadas en los diferentes experimentos. Para ello, el ARN total fue cuantificado espectofotométricamente según se describe en el apartado 7.2.

6.4 RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*)

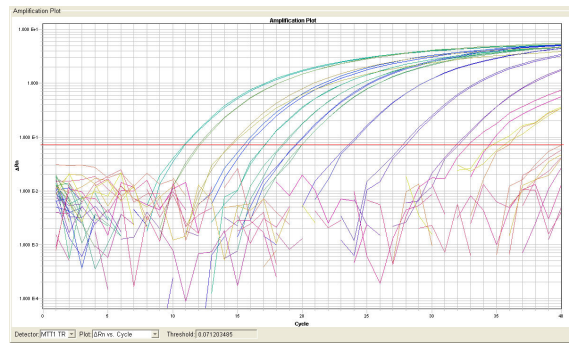
Para obtener la secuencia completa de algunos transcritos se aplicó la técnica 5'/3' RACE. Esta metodología permite amplificar la secuencia nucleotídica completa de un ARNm molde si se conoce su región interna. Para ello, a partir de la secuencia interna conocida, se diseñaron dos cebadores específicos (Tabla 10) orientados en sentido opuesto que dirigen la amplificación de moléculas de ADNc solapantes, y se aplicaron los protocolos suministrados en los kits *5' / 3' RACE kit 2nd generation system* (Roche) y *3' RACE system for rapid amplification of cDNA ends* (Invitrogen).

6.5 RT-PCR cuantitativa o a tiempo real

Los ADNc sintetizados según se describe en el 6.3 se amplificaron por duplicado en placas de 96 pocillos (Applied Biosystems), empleándose el agente intercalante de ADN SYBR Green como detector. Cada reacción de PCR contenía, en un volumen total de 20 µl, la mezcla maestra SYBR Green PCR Master Mix 1x (Applied Biosystems), 300 nM de cada uno de los dos cebadores específicos y 5 µl de una dilución 1/10 del ADNc molde (aproximadamente 0,125 µg) (apartado 6.3). Las reacciones de PCR a tiempo real se llevaron a cabo en un termociclador *ABI PRISM 7700 HT Real Time PCR System* o *ABI PRIMS 7900 HT Real Time PCR System* (Applied Biosystems), utilizando el siguiente programa: 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos (15 minutos a 95 °C y 1 minuto a 50 °C). Las secuencias de cada uno de los cebadores empleados se muestran en la Tabla 11.

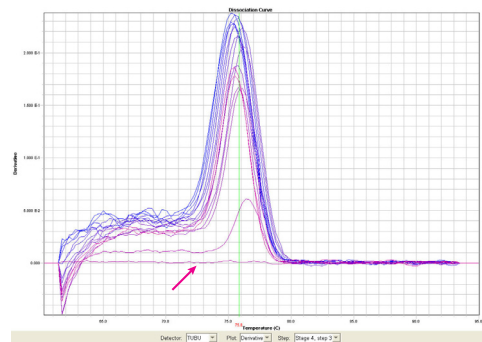
Se realizaron dos tipos de control: a) Controles RT-, para detectar la posible amplificación a partir de ADN genómico (no eliminado tras el tratamiento con DNasa I) presente en las muestras de ARN. En estos controles la reacción de PCR se lleva a cabo usando ARN como molde, en lugar de ADNc. b) Controles NTC, para detectar elementos contaminantes en los

Figura 9. Curva de amplificación. Se muestra a modo de ejemplo una de las curvas de amplificación obtenida en las reacciones de RT-PCR cuantitativa. La línea roja representa el umbral o *threshold* fijado, a partir del cual la fluorescencia detectada es significativamente superior a la fluorescencia basal. El umbral se emplea para la determinación del Ciclo *threshold* (Ct), ciclo de amplificación en el cual la fluorescencia de la muestra supera el umbral.



distintos componentes de la mezcla de reacción de PCR, así como la posibilidad de que los cebadores formen dímeros que puedan emitir fluorescencia. En estos controles se sustituye el ADNc molde por H₂O. En todos los casos ambos controles fueron negativos.

La especificidad de todos los cebadores empleados fue analizada por RT-PCR cuantitativa, obteniéndose en las curvas de desnaturalización un único pico que corresponde a un único producto de PCR (Figura 10). Así mismo, el tamaño y secuencia de los amplicones obtenidos para cada pareja de cebadores fue confirmado por electroforesis en geles de agarosa y secuenciación.



Para cada uno de los genes problema, así como para el gen utilizado como control endógeno o constitutivo (*ATU1*), se realizaron curvas estándar empleando diluciones decimales de ADNc a partir de una muestra de concentración conocida. Las curvas se obtienen representando los valores Ct (ciclos *threshold*), o número de ciclos de PCR a partir de los cuales la señal de fluorescencia detectada es mayor que el nivel mínimo de detección, frente al logaritmo de la cantidad de molde de cada dilución (Figura 11). En aquellos genes en que la eficacia de amplificación del gen control endógeno y la del gen problema fueron aproximadamente iguales (Tabla 14) y que la diferencia entre la pendiente del gen endógeno y la de los genes problema resultó menor de 0,1 se aplicó el Método de $\Delta\Delta C_t$ para la cuantificación relativa de los niveles de expresión (Applied Biosystems, 1997). Los niveles de expresión de cada gen problema se normalizan respecto al gen control constitutivo, restando el valor Ct del gen problema

Figura 10. Curva de disociación. A modo de ejemplo se muestra la curva de disociación obtenida en las reacciones de RT-PCR cuantitativa empleando la pareja de cebadores ATUB1/ATUB2 (Tabla 11), que amplifica un fragmento del gen constitutivo *ATU1* (α -tubulina). En las distintas muestras analizadas se observa un único pico, correspondiente a un único amplicón con una T_m característica. Se observa también como el control negativo NTC no produce amplificación (flecha). Para cada pareja de cebadores empleada en las reacciones de RT-PCR cuantitativa se obtuvieron curvas de disociación similares.

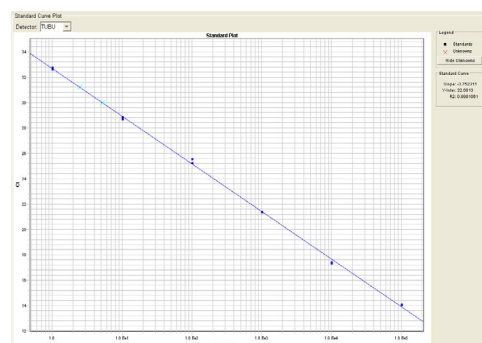


Figura 11. Curva estándar (Standard curve). Ejemplo de curva estándar obtenida empleando diluciones decimales de ADNc a partir de una muestra de concentración conocida. Las curvas se obtienen representando los valores Ct (ciclo *threshold*) frente al logaritmo de la cantidad de molde de cada dilución.

al valor Ct del gen control. El resultado de esta diferencia (ΔC_t) es el exponente en base 2 que indica la cantidad de ARNm del gen problema.

Por el contrario, cuando la diferencia existente entre las pendientes de las curvas del gen control constitutivo y el gen problema era superior a 0,1 se aplicó el método de cuantificación relativa mediante curvas estándar (*Standard-curve quantitation method*) (Applied Biosystems, 2008). Para cuantificar los niveles de expresión normalizados respecto al gen control constitutivo se construyen, para ambos genes, curvas estándar empleando diluciones decimales de ADNc a partir de una muestra de concentración conocida. La cantidad de cada gen se determina interpolando en su curva estándar. Posteriormente, los niveles de expresión del gen problema normalizados se obtienen dividiendo la cantidad de gen problema entre la cantidad de gen control constitutivo.

Gen	Cebadores	S	E	R ²
<i>gfp</i>	GFPQA/GFPQB	-2,94	2,19	0,99
<i>lucFF</i>	LUCQA/LUQB	-3,79	1,83	0,99
<i>TrosATU1</i>	ATU1QA/ATU1QB	-3,74	0,86	0,99
<i>TrosMTT1</i>	MTT1TRQA/MTT1TRQB	-3,90	0,74	0,99
<i>TrosMTT2</i>	MTT2TRQA/MTT2TRQB	-3,75	0,87	0,99
<i>TtheATU1</i>	ATU1QA/ATU1QB	-3,22	2,04	0,99
<i>TthebZIP1</i>	APIIQA/APIIQB	-3,42	1,96	0,99
<i>TthebZIP2</i>	APIIIQA/APIIIQB	-3,56	1,91	0,99
<i>TthebZIP3</i>	APIIIQA/APIIIQB	-3,47	1,94	0,99
<i>TtheMTT1</i>	MTT1QA/MTT1QB	-3,18	2,06	0,99
<i>TtheMTT3</i>	MTT3QA/MTT3QB	-3,27	2,02	0,99
<i>TtheMTT5</i>	MTT5QA/MTT5QB	-3,34	1,99	1
<i>TtYPCS</i>	FQSQA/FQSQB	-3,12	2,09	0,99

Tabla 14. Parámetros de la recta patrón obtenida para cada uno de los genes analizados por RT-PCR cuantitativa, incluido el gen control endógeno (*ATU1*). S: pendiente de la recta. E: eficacia de amplificación calculada a partir de la ecuación $E=10(-1/S)$. R²: coeficiente de correlación.

7 MÉTODOS ELECTROFORÉTICOS

7.1 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Las electroforesis estándar de ADN se realizaron en geles de agarosa (Pronadisa) al 1 % o 1,5 % en tampón TAE 1x (Tabla 7) tal y como se describe en Sambrook y Russell (2001). Los geles se corrieron a 10 V/cm durante 25 minutos, y tras tinción con bromuro de etidio 1 µg/ml (Sigma) y destañido en agua destilada, fueron visualizados bajo luz ultravioleta de 320 nm (*UVIpro Platinum System*, Durviz S.L.). Los marcadores de tamaño molecular de ADN empleados fueron M 1kb, M-II o M-VI (Roche) que presentan unos rangos de tamaño de 23 - 0,125 kb, 2,1 - 0,154 kb y 11,1 - 0,19 kb respectivamente. Además, se utilizaron los marcadores de tamaño molecular marcados con digoxigenina (Roche) M-II y M-VI con rangos de tamaño idénticos a los correspondientes sin digoxigenina. Se emplearon estos últimos en aquellos geles que después serían transferidos a membranas de nylon⁺ (Roche).

7.2 Electroforesis de ARN en geles desnaturizantes de agarosa

Las electroforesis de ARN se realizaron en geles de agarosa al 1,2 % (Pronadisa) conteniendo formaldehído 2,2 M (Merk) como agente desnaturizante, de acuerdo al protocolo descrito en Sambrook y Rusell (2001). Las muestras de ARN fueron incubadas a 65 °C durante 3-5 minutos en tampón de carga 5x (Tabla 7). Tras esto se añadió a las muestras bromuro de etidio 1 µg/ml. Los geles fueron resueltos a 10 V/cm durante 1 hora en tampón de electroforesis de ARN pH 8 1x (Tabla 7), y finalmente el ARN fue visualizado bajo luz ultravioleta (*UVIpro Platinum System*, Durviz S.L.). Tanto el material como las soluciones empleadas fueron tratados con DEPC (Sigma) al 0,1% (v/v) en H₂O bidestilada, como se describió en el apartado 5.2, con el fin de inactivar las RNasas presentes.

7.3 Electroforesis de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS fue realizada según el procedimiento descrito por (Laemmli 1970) en un sistema vertical *Mini Protean II™* (Bio-Rad) a 10 V/cm en tampón Tris Glicina SDS 1x (Tabla 10). Este tipo de electroforesis se llevó a cabo en un gel compuesto por dos fases: un gel superior concentrante, con un porcentaje de acrilamida más bajo y un pH de 6,8, y un gel inferior de resolución, con un porcentaje mayor de acrilamida y un pH de 8,8 (Tabla 15). Como patrones de masa molecular se utilizaron los marcadores preteñidos de rango 20-200 kDa (Bio-Rad) ó 20-120 kDa (Fermentas).

Gel separador	
Componentes	Volumen (ml)
H ₂ O	4
Acrilamida-bisacrilamida (29:1)	5
TrisHCl 1M pH 8,8	5,62
SDS 10 %	0,075
Persulfato amónico 10 %	0,075
TEMED	0,0075
Gel concentrador	
Componentes	Volumen (ml)
H ₂ O	2,55
Acrilamida-bisacrilamida (29:1)	0,625
TrisHCl 1M pH 8,8	0,475
SDS 10 %	0,0375
Persulfato amónico 10 %	0,0375
TEMED	0,0025

Tabla 15. Composición de los geles de poliacrilamida empleados en las electroforesis SDS-PAGE.

7.3.1 Tinción de geles de proteínas con plata compatible con espectrometría de masas

Tras la electroforesis de proteínas los geles de poliacrilamida fueron incubados durante toda la noche en una solución de ácido acético (Merk) al 5 % y metanol (Merk) al 50 %. Posteriormente fueron lavados en metanol al 50 % durante y en H₂O Milli Q durante 15 minutos,

incubados durante 1 minuto en una solución de tiosulfato sódico (Amersham) al 0,01 %, y una solución de nitrato de plata (Amersham) al 0,1 % durante 20 minutos a 4 °C. Tras la etapa de tinción, los geles fueron lavados nuevamente en H₂O Milli Q, y revelados en una solución de carbonato sódico (Amersham) al 2 % en formalina al 0,04 %. Las proteínas teñidas fueron fijadas incubando el gel durante 5 minutos en una solución de acético al 5 %. Los geles se conservaron en ácido acético al 1 % en H₂O Milli Q a 4 °C hasta la extracción de bandas de proteínas para espectrometría de masas.

7.4 Electroforesis capilar

Los cultivos de *T. thermophila* (control y tratados con CdCl₂ 2,67 x 10⁻⁵ M durante 5 días) fueron centrifugados a 500 g durante 3 minutos. Después de la retirada del medio de cultivo, las células fueron lavadas en tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8 y el sedimento celular resuspendido en 500 µl de HCl 0,1 M, para después romper las células por sonicación. Tras esto, los restos celulares fueron eliminados centrifugando a 10.500 g a 4 °C durante 15 minutos, y el sobrenadante obtenido fue conservado a -20 °C hasta su utilización para el análisis de fitoquelatinas.

Las muestras fueron analizadas mediante electroforesis capilar por el Dr. Enrique Torres, de la Facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña (A Coruña). El análisis electroforético se desarrolló en el sistema *HP^{3D} CE Capillary Electrophoresis System* (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) según se indica en Pérez-Rama *et al.* (2005).

8 CLONACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN

8.1 Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

La relación ADN/endonucleasa utilizada en las reacciones de digestión fue de 1 unidad de enzima por cada µg de ADN (excepto que se indique lo contrario), en el tampón de digestión adecuado y las condiciones sugeridas por el fabricante (Tabla 16). Todas las reacciones de digestión fueron analizadas mediante electroforesis de ADN en geles de agarosa.

Enzimas empleadas	Condiciones	
	Tampón	Tiempo y temperatura
<i>EcoRI</i> (Takara)	Tampón H (Takara)	1 h a 37°C
<i>ApaI</i> (Fermentas) + <i>XhoI</i> (Fermentas)	Tampón G (Fermentas)	2 h a 37 °C
<i>BamHI</i> (Fermentas) + <i>HindIII</i> (Fermentas)	Tampón <i>BamHI</i> (Fermentas)	2 h a 37 °C (doble concentración de <i>HindIII</i> respecto a <i>BamHI</i>)
<i>KpnI</i> (NEB) + <i>SacI</i> (NEB)	Tampón NEB1 (NEB) + BSA (0,1 µg/µl)	24 h a 37°C

Tabla 16. Condiciones y enzimas de restricción empleadas en las digestiones sencillas o dobles de ADN. La composición de los tampones utilizados se detalla en la Tabla 10.

8.2 Plásmidos utilizados

En la Tabla 17 se indican las principales características de los plásmidos utilizados en este trabajo. Así mismo, en la Figura 12 se detalla una representación esquemática de cada uno de ellos.

Plásmido	Marcador	Utilidad	Procedencia
pCR2.1 TOPO (Invitrogen)	Amp ^R , Kn ^R , plac-lacZ	Vector de clonación en <i>E. coli</i>	Invitrogen
pVGF.MTT	Amp ^R	Vector de expresión en <i>T. thermophila</i>	A. Turkewitz
pBt(-7)Luc	Amp ^R	Vector para inserción dirigida en el locus <i>btuI</i> de <i>T. thermophila</i> .	D. Romero

Tabla 17. Características y utilidad de los vectores utilizados en este trabajo. Amp^R: gen de resistencia a ampicilina. Kn^R: gen de resistencia a kanamicina. plac-lacZ: promotor y gen *lacZ*.

8.3 Inserción del fragmento de ADN en el plásmido

8.3.1 Reacción de ligación con el plásmido pCR[®]2.1 TOPO

Para la clonación de los amplicones en el vector pCR[®]2.1 TOPO[®] (Figura 12) se siguieron las instrucciones suministradas en el kit comercial TOPO[™] TA Cloning[®] (Invitrogen), que se basa en la metodología denominada *TA cloning*. Los amplicones producidos por la enzima Taq ADN polimerasa presentan en sus extremos 3' un residuo de dATP, formando extremos protuberantes. Como resultado de esto, el producto de PCR puede ser directamente ligado en el vector, que presenta extremos 3'-T complementarios, gracias a la acción de la enzima topoisomerasa I del virus *Vaccinia* incluida con el vector. Cada reacción de clonación fue incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente, conteniendo en un volumen total de 6 µl: 4 µl del producto de PCR, 1 µl del vector pCR[®]2.1 TOPO[®], 1 µl de solución salina (NaCl 1,2 M y MgCl₂ 0,06 M) y 1 µl de H₂O estéril.

8.3.2 Reacción de ligación con los plásmidos pVGF.MTT y pBtΔ(-7)Luc

Para la ligación de fragmentos de ADN en los vectores pVGF.MTT y pBtΔ(-7)Luc (Figura 12) se utilizó la ADN ligasa del fago T4, la cual, utilizando ATP como cofactor, repara los cortes en las cadenas de doble hebra y une los fragmentos de restricción de ADN de doble hebra con extremos romos o cohesivos.

A 50 o 100 ng del vector linearizado se le añadió la cantidad del inserto necesaria para obtener una relación molar vector:inserto 1:3 y 1:6. A la mezcla vector-inserto se le añadieron: tampón de ligación 1x (*10x Ligation Buffer for T4 ligase*, Fermentas), 5 unidades de la enzima

T4 DNA ligase (Fermentas), y agua Milli Q (Millipore) hasta un volumen total de reacción de 20 μ l. Esta mezcla fue incubada a 22 °C durante toda la noche, y posteriormente empleada para transformar células competentes de *E. coli* mediante choque térmico (apartado 8.4).

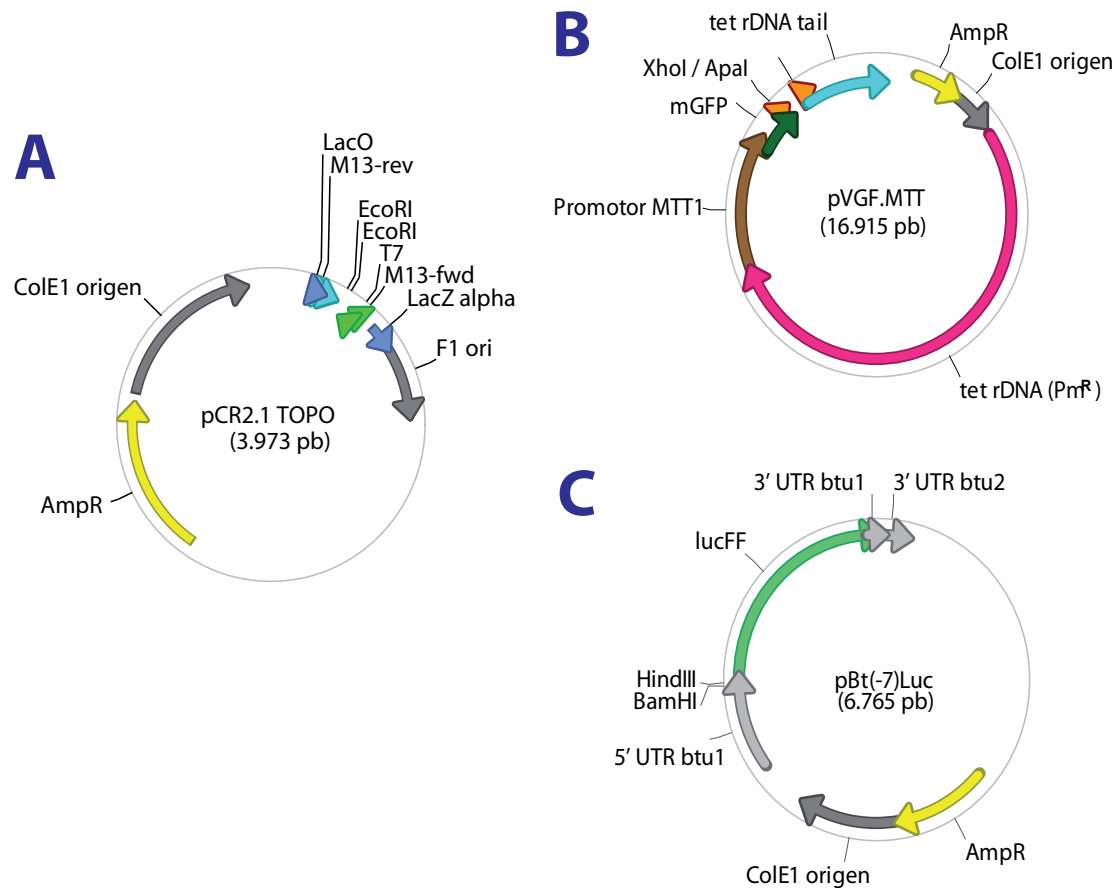


Figura 12. Representación esquemática de los vectores empleados en este trabajo y sus principales características. (A): vector pCR2.1TOPO (Invitrogen). (B): vector pVGF.MTT. (C): vector pBt Δ (-7)Luc. 5' y 3' UTR btu1: regiones 5' y 3'UTR del gen *BTU1*. Amp^R: gen de resistencia a ampicilina. BamHI: diana de la endonucleasa *Bam*HI. ColE1 origen: origen de replicación en *E. coli*. EcoRI: diana de la endonucleasa *Eco*RI. HindIII: diana de la endonucleasa *Hind*III. LacO: promotor *lac*. LacZalpha: ORF del gen *lacZ*. lucFF: ORF del gen *lucFF*. M13-rev y M13-fwd: secuencias del cebador M13. mGFP: ORF del gen *gfp*. Promotor MTT1: promotor del gen *TheMTT1*. tetrDNA(Pm^R): región de ADN recombinante de *T. thermophila* que confiere resistencia a paramomicina (Pm^R) y permite la replicación del vector en el ciliado. tetrDNAtail: región de ADN recombinante de *T. thermophila*. Xho1/Apa1: dianas de restricción para las endonucleasas *Xho*1 y *Apa*1.

8.4 Transformación de *E. coli* y selección de clones positivos

Las construcciones realizadas con los plásmidos empleados (apartado 8.2) fueron introducidas en *E. coli* mediante transformación por choque térmico. Para ello 4 μ l de la reacción de ligación (apartado 8.3) fueron incubados durante 30 minutos en hielo con las bacterias competentes *One Shot*[®] TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen). El choque térmico se llevó a cabo incubando las bacterias a 42 °C durante 30 segundos y posteriormente en hielo durante 5 minutos. A continuación, las bacterias fueron incubadas en 250 μ l de medio SOC (Invitrogen) a 37 °C durante 1h en agitación suave, y finalmente sembradas en césped sobre placas de LB agar (Pronadisa) suplementado con kanamicina o ampicilina 50 μ g/ml (Sigma).

La selección de las bacterias transformantes se realizó utilizando como marcador la resistencia a kanamicina o ampicilina (según la característica conferida por el vector). La selección de colonias transformantes recombinantes para el vector *pCR[®]2.1 TOPO[®]* se realizó añadiendo 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido (X-Gal) 40 mg/ml (Sigma) al medio y analizando actividad β -galactosidasa. Las colonias con el vector recombinante presentan color blanco, mientras que las no recombinantes son de color azul. Las colonias seleccionadas (blancas) fueron aisladas del agar y resembradas en medio LB líquido conteniendo ampicilina 50 μ g/ml, donde se incubaron a 37 °C durante 16-18 horas en agitación, para proceder posteriormente al aislamiento del ADN plasmídico (apartado 5.3).

9 SECUENCIACIÓN DE ADN

La secuenciación se llevó a cabo por el método dideoxi (Hindley y Staden 1983) y el kit comercial *Big-dyeTM* (Applied Biosystems), empleando el secuenciador automático 3730 *DNA Analyzer Applied Biosystems* (Applied Biosystems) del Servicio de Genómica y Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid.

10 TRANSFORMACIÓN DE *T. thermophila*

10.1 Transformación por electroporación de células conjugantes de *T. thermophila*

Las cepas CU428.1 y B2086 de distinto tipo conjugante (Tabla 5) fueron cultivadas separadamente, en matraces de 250 ml conteniendo 50 ml de medio SPPA (Tabla 6), hasta una densidad celular de $3\text{--}5 \times 10^5$ células/ml. Tras la retirada del medio de cultivo, las células fueron lavadas y resuspendidas en tampón DMC (Tabla 7) para someterlas a un proceso de inanición a 30 °C durante 6-12 horas. Tras esto se ajustó la concentración celular de cada estirpe a 3×10^5 células/ml, y se combinaron ambas en un matraz de 2 litros. Tras añadir 1 ml de solución streptomomicina/penicilina/anfotericina 100x (Sigma) la mezcla se incubó a 30°C en agitación (160 rpm), con el fin de prevenir la formación de pares conjugantes. La agitación se programó para que se detuviese 10 horas antes de la electroporación. En este punto, hay que considerar que las células han sido sometidas al proceso de inanición durante 18-24 horas antes de detener la agitación. De este modo, las células comenzarán a formar pares conjugantes 1 hora después de que la agitación cese. Cuatro horas más tarde desde que la agitación se detuvo, se comprobó que más del 80 % de las células estaban formando pares conjugantes. Y finalmente, a las 10 horas, se recogieron las células centrifugando a 1.100 g, se lavaron en tampón Hepes 10 mM pH 7.5 (Tabla 7) y el sedimento celular fue resuspendido en 1 ml de este tampón, obteniéndose una concentración de aproximadamente 3×10^7 células/ml.

En una cubeta de electroporación de 0,2 cm de anchura se mezclaron 125 µl de este concentrado celular con el ADN transformante (50 µg de ADN plasmídico resuspendido en 125 µl tampón de Hepes 10 mM pH 7.5), y las células fueron sometidas a un pulso de corriente de 1.125 V/cm durante 4 ms (250 V, de 275 µF de capacitancia y 13 Ω de resistencia), empleando el electroporador *ECM 600* (BTX Inc., La Jolla, California, USA). Tras la electroporación, las células fueron incubadas a temperatura ambiente durante 1 minuto, resuspendidas en 20 ml de medio SPPA y transferidas a microplacas de 96 pocillos aplicando un factor de dilución de ½ y ¼. Transcurridas 12-18 horas de incubación a 30 °C se añadió paramomicina (Sigma) a una concentración final de 120 µg/ml. Los cultivos se mantuvieron durante 4-5 días a 30 °C, y finalmente se seleccionaron las células transformantes analizando resistencia a paramomicina. Las células transformantes positivas fueron mantenidas bajo presión continua de paramomicina 120 µg/ml en medio PP210. La presencia de la construcción reportera en las células transformantes resistentes a paramomicina fue confirmada mediante microscopía de fluorescencia, detectando la presencia de la proteína de fusión GFP-MT, tras inducir la expresión del promotor de *TtheMTT1* del plásmido con Cd 9×10^{-7} M (CdCl₂, Sigma) en medio PP210 o tampón TrisHCl 0,01 M pH 6,8 durante 2h a 30 °C.

10.2 Transformación biolística del macronúcleo de *T. thermophila* cepa CU522

T. thermophila cepa CU522 fue cultivada en 50 ml de medio de cultivo SPPA (Tabla 6) a 30 °C y en agitación (100 rpm) hasta una densidad celular de $2-4 \times 10^5$ células/ml, y sometida a inanición en tampón DMC (Tabla 7) a 30 °C y agitación (100 rpm) durante 12-18 horas previas al proceso de transformación.

De acuerdo con el protocolo descrito en Gaertig y Kapler (2000), se prepararon los microproyectiles de oro (50 µl en 50 µl glicerol al 50 %) (*Microcarrier Gold 1.0 µm*, Bio-Rad), y el resto de material necesario (1 *flying disk*, 1 *stopping screen* y 2 *rupture disks* por cada disparo), momentos antes de la transformación. Las células fueron recogidas por centrifugación, resuspendidas en 1 ml de tampón DMC, y este concentrado celular fue transferido a una placa Petri conteniendo una membrana circular estéril Whatman #1 de 9 cm de diámetro. Los microproyectiles de oro, recubiertos con aproximadamente 1 µg de ADN de la construcción reportera (digerida con las enzimas de restricción *KpnI* y *SacI* (Fermentas)) como se indica en Gaertig y Kapler (2000), fueron introducidos en las células mediante bombardeo biolístico utilizando el sistema *BioRad PDS-1000/He* (Bio-Rad), empleando una presión de disparo de 900 psi aproximadamente y 27 mm Hg de vacío, y de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Inmediatamente después las células fueron transferidas a 50 ml de medio SPPA, mantenido a 30 °C y 100 rpm de agitación durante 4-6 h. Tras esto, se añadió paclitaxel (Sigma) hasta una concentración final de 20 µM, y las células fueron distribuidas en microplacas de 96 pocillos en alícuotas de 200 µl/pocillo. La selección de células transformantes se realizó testando la resistencia a paclitaxel durante 4-7 días a 30 °C. Se confirmó la presencia de la construcción reportera en

locus *btu1-1* macronuclear de las células resistentes mediante PCR del ADN genómico aislado empleando los cebadores PBTFw y PBTRRev (Tabla 10).

10.3 Aislamiento de clones y establecimiento de líneas clonales recombinantes de *T. thermophila*

A partir de los transformantes positivos se establecieron líneas clonales aislando físicamente células individuales en gotas independientes de medio PP210 (Tabla 6) conteniendo paclitaxel 20 μ M, tal y como se describe en Bruns y Cassidy-Hanley (2000). De este modo, gotas de aproximadamente 30 μ l fueron dispuestas en una placa Petri siguiendo un patrón de 6 x 8 gotas coincidente con los pocillos de microplacas de 96 pocillos. Tras incubar durante 48-72 horas las placas Petri a temperatura ambiente en cámara húmeda, el número de células aumentó lo suficiente para permitir la transferencia de los clones a microplacas de 96 pocillos mediante el uso de un replicador de placas.

Las líneas clonales fueron mantenidas bajo presión selectiva continua de paclitaxel (20-50 μ M) hasta asegurar que el 100 % de los alelos *btu1-1* del macronúcleo fuesen reemplazados por la construcción reportera, según el proceso de segregación fenotípica macronuclear (*phenotypic assortment*) (Merriam y Bruns 1988; Doerder *et al.* 1992). Para ello, las células fueron transferidas cada 2-3 días a concentraciones superiores de paclitaxel progresivamente, hasta que fueron capaces de crecer en presencia de paclitaxel 50 μ M. A partir de este momento fueron transferidas diariamente en medio PP210 conteniendo paclitaxel 50 μ M durante 5 días. Tras esto, los clones resistentes fueron mantenidos en medio PP210 sin paclitaxel durante 4 días, para eliminar los posibles efectos residuales de la droga, y posteriormente se confirmó la sustitución del 100 % del alelo *btu1-1* en todos los locus *btu1* del macronúcleo, mediante dos tipos de análisis. En primer lugar, a partir de cada clon resistente se aislaron 16 subclones, tal y como se describió anteriormente, en medio PP210 y paclitaxel 20 μ M. Se consideró que el 100 % de los alelos *btu1-1* habían sido reemplazados con la construcción en aquellas líneas clonales que presentaron los 16 subclones resistentes a paclitaxel. Y en segundo lugar se analizó el ADN genómico de los mutantes, mediante PCR estándar empleando los cebadores 5UTRBTU y 3UTRBTUB, (Tabla 10) situados en las zonas adyacentes al sitio de inserción de la construcción.

11 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ADN-PROTEÍNA

11.1 Preparación de extractos nucleares

Para la obtención de extractos nucleares se siguió el protocolo descrito en Barchetta *et al.* (2008). A partir de distintos cultivos derivados del mismo inóculo, se recogieron 1×10^7

células por centrifugación (1.100 g, 5 minutos). El pellet celular fue lisado a 4°C añadiendo 800 µl de tampón de lisis (Tabla 7), conteniendo un cóctel comercial de inhibidores de proteasas (Sigma) (100 µl/ml), PMSF 1mM (Fluca) y DTT 0,5 mM (Sigma). El lisado celular fue centrifugado a 15.000 g durante 10 minutos a 4°C, y el sobrenadante descartado. La presencia de núcleos intactos fue comprobada mediante tinción con yoduro de propidio y observación bajo el microscopio de fluorescencia. El pellet fue resuspendido en 300 µl de tampón de extracción frío (Tabla 7) e incubado a 4°C durante 20 minutos. Tras esto, los restos celulares fueron eliminados por centrifugación a 15.000 g durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue repartido en alícuotas de 30 µl que fueron congeladas inmediatamente en N₂ líquido y conservadas a -80°C.

11.2 Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)

El ensayo se basa en la diferencia de movilidad electroforética entre un fragmento de ADN y el complejo formado por una o varias proteínas unidas a dicho fragmento. El fragmento de ADN y las proteínas son mezclados en un tampón adecuado para que se produzca la unión de las proteínas al ácido nucleico. La mezcla es separada por electroforesis en condiciones no desnaturizantes, de manera que la migración del complejo ADN-proteína se verá retardado respecto al ADN libre. El EMSA fue desarrollado siguiendo las indicaciones de Hellman y Fried (2007) y Molloy (2000) con ciertas modificaciones. Todas las soluciones empleadas para estos ensayos fueron preparadas en agua Milli Q (Millipore).

En los ensayos de retardo que se realizaron en este trabajo se emplearon dos fragmentos de ADN de cadena sencilla complementaria marcados en su extremo 5' con digoxigenina (DIG), que contenían el sitio de reconocimiento y unión del factor de transcripción de estudio (Tabla 18). Se mezclaron 10 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos complementarios en tampón TEN (Tabla 7). Esta solución fue incubada en condiciones de descenso progresivo de temperatura desde 95 hasta 25 °C en un termociclador (disminución de 1°C cada minuto), para permitir el correcto alineamiento de los dos oligonucleótidos complementarios de cadena sencilla.

Con el fin de determinar las condiciones óptimas para que se produzca la unión de la proteína al ADN marcado, se ensayaron distintas reacciones variando la concentración de cada uno de los componentes (Tabla 19). El extracto nuclear (3 – 75 µg) fue incubado junto con el ADN marcado (50 fmoles) en tampón de unión (Tabla 7) y 1 µg de poli(dI-dC). Cada reacción, con un volumen final 20 µl, fue incubada a temperatura ambiente durante 20 minutos. La reacción de unión fue detenida añadiendo tampón de carga 5x (Tabla 7), y las muestras fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 % (Tabla 20) en condiciones no desnaturizantes, a 10 V/cm durante 2 horas en tampón TBE 1x (Tris 50 mM, Ácido bórico 89 mM, Na₂EDTA 2 mM), empleando el sistema Mini Protean II™ (Bio-Rad).

El ADN fue electrotransferido a una membrana de nylon⁺ (Roche) bajo un voltaje constante de 100 V en tampón TBE 1x durante 2 h empleando el sistema *Mini Trans-blot Cell*

Oligonucleótido	Secuencia (5' → 3')
MTCMFw	DIG-AATTTATG TGATTCA TGAGTCTAGC
MTCMRev	DIG-GCTAGACTCA TGAATCA CATAAATT
MTCMAB2	AATTTATG TGATTCA TGAGTCTAGCAATTTATG TGATTCA TGAGTCTAGC TTAAATAC ACTAAGT ACTCAGATCGTTAAATAC ACTAAGT ACTCAGATCG

Tabla 18. Oligonucleótidos utilizados en los ensayos EMSA y en la purificación parcial de proteínas de unión a MTCM1. DIG: extremo 5' marcado con digoxigenina. Los tres oligonucleótidos fueron sintetizados con un grado de pureza HPLC. En negrita se indica la localización del motivo TGANTCA.

(Bio-Rad). Posteriormente el ADN fue fijado a la membrana mediante luz ultravioleta (254 nm) durante 35 segundos (*Spectrolinker XL-100*, Spectronics Corporation). La detección del ADN marcado se realizó a través de una reacción quimioluminiscente empleando un anticuerpo anti-DIG conjugado con la fosfatasa alcalina (*Anti-DIG Fab fragments*, Roche). Para ello, tras lavar la membrana de nylon⁺ en tampón de lavado, ésta fue incubada durante 30 minutos en solución de bloqueo 1x (Roche), con el fin de evitar la unión inespecífica del anticuerpo anti-DIG a la membrana. Tras esto se añadió el anticuerpo diluido en solución de bloqueo 1x durante 30 minutos. La membrana fue lavada de nuevo en tampón de lavado (Roche) e incubada en tampón de detección durante 5 minutos. Todas estas incubaciones fueron realizadas a temperatura ambiente. Finalmente se añadió el sustrato CSPD a la membrana, incubando durante 5 minutos. Este compuesto es desfosforilado por la fosfatasa alcalina, produciendo un intermediario inestable que al romperse produce luz con un pico máximo de emisión a 477 nm. Para aumentar la reacción quimioluminiscente, la membrana fue incubada durante 10 minutos a 37 °C y finalmente expuesta a una película de rayos X (X-Omat 100, Kodak) desde 30 minutos hasta 16 horas según se requería.

Componente	Reacción					
	1	2	3	4	5	6
	Volumen (μl)					
Extracto nuclear (3-75 μg/μl)	0	2	4	6	8	12
Tampón de unión	12	10	8	6	4	2
poli(dI-dC) (1 μg/μl)	1	1	1	1	1	1
MgCl ₂ (25 mM)	2	2	2	2	2	2
ADN sonda (50 fmol/μl)	1	1	1	1	1	1
H ₂ O Milli Q	4	4	4	4	4	2

Tabla 19. Reacciones de unión ADN-proteína llevadas a cabo en los ensayos de retardo.

Componentes	Volumen
Tampón TBE 10x	2 ml
Acrilamida-bisacrilamida 40 % v/v	5 ml
H ₂ O	13 ml
Persulfato amónico	0,05 g
TEMED	12 μl

Tabla 20. Composición de los geles de poli(acrilamida) al 10 % empleados en los ensayos de retardo.

11.3 Southwestern blot

En esta metodología las proteínas presentes en un extracto nuclear son separadas mediante una electroforesis de proteínas SDS-PAGE, e inmediatamente transferidas a una membrana PVDF. Tras la renaturalización de las proteínas unidas a la membrana, se ensaya la unión de un oligonucleótido marcado a éstas, incubando en las condiciones óptimas de unión ADN-proteína determinadas previamente (apartado 11.2). Detectando la presencia del ADN marcado en la membrana, y con la ayuda de marcadores de masa molecular, se puede conocer

la masa molecular de la proteína a la que está unido el ADN marcado. Comparando la masa molecular obtenida con la inferida informáticamente a partir de su secuencia aminoacídica, podremos identificar diversas proteínas candidatas, entre las cuales estará aquella que estamos buscando.

Una vez comprobada la interacción entre las proteínas nucleares y el fragmento de ADN estudiado, se trató de identificar estas proteínas mediante la técnica de *Southwestern blotting*, siguiendo para ello las indicaciones descritas en Siu *et al.* (2008) y Labbé *et al.* (2001) con ciertas modificaciones. El extracto de proteínas nucleares se preparó de forma análoga a como se describe en el apartado 11.1, al igual que los oligonucleótidos marcados con DIG, que fueron los mismos que se emplearon en dicho experimento (Tabla 18).

En primer lugar el extracto nuclear fue separado por electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) como se indica en el apartado 7.3. Previo a la electroforesis, las muestras no fueron hervidas para evitar alteraciones irreversibles en la estructura de las proteínas que impidiesen la renaturalización posterior. Los geles fueron resueltos a 10 V/cm durante 2 h a 4 °C, y tras esto, las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana PVDF durante 2h a 150 mA a 4 °C en tampón de electrotransferencia (Tabla 7) empleando el sistema *Mini-Transblot Cell* (Bio-Rad). A continuación se procedió a la renaturalización de las proteínas incubando la membrana en tampón TNED (Tabla 7) conteniendo 5 % de leche desnatada en polvo (Central Lechera Asturiana). Tras cuatro horas de incubación a temperatura ambiente, se añadió el oligonucleótido marcado (50 fmol/μl) en tampón TNED con 5 % de leche en polvo, incubando a temperatura ambiente durante toda la noche. La membrana fue lavada en tampón TNED conteniendo 5 % de leche en polvo y se procedió a la detección del oligonucleótido marcado mediante una reacción quimioluminiscente, como se indica en el apartado 11.2.

11.4 Purificación parcial de proteínas de unión a ADN

Para la purificación de las proteínas de *T. thermophila* que interaccionan con el motivo MTCM1 se empleó el kit comercial *DNA-protein binding purification kit* (Roche), que se basa en la utilización de un oligonucleótido (que contiene el sitio de unión de la/s proteína/s de interés) acoplado a microperlas de estreptavidina.

El oligonucleótido (MTCMAB2) empleado contenía dos repeticiones seguidas del motivo MTCM1 (Tabla 18). Fue acoplado a las microperlas magnéticas de estreptavidina, mediante una reacción de unión con la ligasa T4, siguiendo las instrucciones suministradas en el kit comercial. Para la reacción de unión proteína al oligo MTCMAB2-estreptavidina se incubaron 50 μg del extracto nuclear con las microperlas en tampón de unión (Tabla 7), poli(dI-dC) 6,5 μg y poli-L-lisina (0,65 μg) durante 30 minutos a 25 °C, siguiendo las indicaciones del protocolo suministrado en el kit. Con la ayuda de un separador magnético, el complejo proteínas-oligo MTCMAB2-estreptavidina es separado del resto de proteínas del extracto nuclear. Tras una se-

rie de etapa de lavados, las proteínas unidas al oligonucleótido MTCMAB2 fueron eluidas con tampón de elución (Tabla 10). Las fracciones de elución fueron analizadas mediante electroforesis SDS-PAGE (apartado 7.3) y tinción con plata (apartado 7.3.1).

12 TÉCNICAS MICROSCÓPICAS

12.1 Microscopía de fluorescencia

Las células fueron fijadas en 1 ml de paraformaldehído al 4 % (Merk) durante 30 minutos en oscuridad. Tras dos lavados con tampón Hepes 50 mM pH 7 (Tabla 7), se recogieron las células y se observaron directamente en el portaobjetos.

Por microscopía de fluorescencia se observaron también células vivas, que fueron depositadas directamente en portaobjetos recubiertos de poli-lisina (Sigma), obviando en este caso el proceso de fijación. Todas las preparaciones fueron observadas con el microscopio de fluorescencia Axioplan 2 (Carl-Zeiss), utilizando filtros para fluorescencia verde (480/520-30).

12.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para el proceso de fijación y preparación de células de *T. thermophila* para microscopía electrónica de transmisión se siguió en protocolo descrito en Dentler (2000). De acuerdo con este protocolo, las células fueron prefijadas en una solución de glutaraldehído al 2,5 % (Sigma) en tampón cacodilato sódico 100 mM pH 7,2 (TAAB) durante 1 hora, lavadas en tampón cacodilato sódico 100 mM pH 7,2 (TAAB) y postfijadas en una solución de OsO₄ (TAAB) al 1 % en tampón cacodilato sódico 100 mM durante 45 minutos en hielo. Las células fijadas fueron contrastadas con una solución acuosa de acetato de uranilo al 1 % (TAAB), deshidratadas en una serie de lavados con acetona (25 %, 50 %, 75 % y 100 % en agua desionizada), e incluidas en resina Embed 812 (TAAB), preparada según las instrucciones del fabricante.

Las muestras fueron procesadas en el Centro de Microscopía y Citometría de la UCM. La integridad celular, tras el proceso de fijación, se comprobó mediante observación directa al microscopio óptico de cortes semifinos de las muestras, teñidos con azul de toluidina al 1 %. Posteriormente, mediante un ultramicrotomo (*Ultracut*, Reichert-Jung) se obtuvieron cortes ultrafinos, que fueron montados en las rejillas y contrastados con acetato de uranilo al 2 % en agua bidestilada y solución de Reynolds de citrato de plomo. Finalmente, las muestras fueron observadas en el Microscopio Electrónico de transmisión *JEM1010* (JEOL) a 80 kV.

13 CITOMETRÍA DE FLUJO

Los cultivos de *T. thermophila* en fase exponencial ($1-3 \times 10^5$ células/ml) fueron lavados y resuspendidos en tampón Tris-HCl 0,1 M pH 6,8 y la suspensión celular fue transferida a una placa estéril de 24 pocillos, en alícuotas de 1 ml. Todas las exposiciones al Cd se realizaron a 30 °C durante 2 ó 24 horas en tampón Tris-HCl, de modo que todo el metal añadido se encontrara en forma biodisponible. Se ensayó un rango de concentraciones crecientes con el fin de determinar la mínima concentración de Cd capaz de ser detectada por el biosensor.

La mortalidad celular fue estimada añadiendo, a la suspensión celular en el tubo de citometría, yoduro de propio (IP) a una concentración final de 5 µg/ml. Este fluorocromo se intercala en los ácidos nucleicos de doble cadena, incrementando sensiblemente su fluorescencia. La membrana de las células vivas no permite su paso al interior del citoplasma, de manera que únicamente teñirá las células que tengan dañada su membrana (células muertas) y los núcleos aislados de células lisadas (Haugland *et al.* 2002).

La fluorescencia de la GFP y el IP fue evaluada empleando un citómetro de flujo *FACS-calibur* (Becton Dickinson) equipado con el software *Cell Quest*. La fluorescencia (rojo) producida por el IP excitado por un láser de argón se recogió en el canal FL3 (670 nm LP). En cambio, la fluorescencia (verde) de la proteína GFP excitada por el láser se detectó empleando un filtro de paso de banda (530/30 nm) en el canal FL1. Para calibrar el citómetro se utilizaron cuatro tipos de controles celulares: células transformadas no expuestas al metal y libres de IP, células sin transformar + IP (que no presentaban el gen reportero *gfp*), células transformadas no expuestas al metal pesado + IP (para determinar la expresión basal de la GFP), y células muertas (fijadas con etanol 100 %) + IP.

14 ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA LUCIFERASA

Los cultivos de *T. thermophila* transformantes (cepas MTT1Luc o MTT5Luc) crecidos en medio PP210 hasta densidades de $1-3 \times 10^5$ células/ml fueron centrifugados a 1.100 g durante 3 minutos, lavados y resuspendidos en tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8. La suspensión celular repartida en alícuotas de 5 ml en tubos estériles fue expuesta, durante 2 h a 30 °C, a diferentes concentraciones de cada uno de los metales pesados testados, otros agentes estresantes, o las distintas muestras naturales de suelo o agua analizadas (Tabla 21). Todas las exposiciones a metal pesado se llevaron a cabo en tampón Tris-HCl con la finalidad de que todo el metal se encontrara en forma biodisponible para la célula.

La actividad luciferasa de los biosensores tras su exposición a la muestra, fue cuantificada de tres formas distintas: *in vitro* a partir de extractos celulares, *in vivo* en células permeabilizadas previamente al sustrato D-luciferina, e *in vivo* en células sin ningún tipo de tratamiento.

14.1 Cuantificación de actividad luciferasa *in vitro* a partir de extractos celulares

Tras la exposición de las células al agente estresante o a una muestra natural específica, tal y como se describió en el apartado anterior, las células recogidas por centrifugación fueron lisadas en hielo con 350 μ l de tampón de lisis CCLR 1x (Promega) (Tabla 7). El lisado celular fue centrifugado a 16.250 g durante 2 minutos a 4 °C, y el sobrenadante obtenido fue recogido para la valoración de actividad luciferasa inmediatamente. Los extractos celulares fueron normalizados respecto al contenido en proteína total (0,5 mg/ml), determinada por el método Bradford (Bradford 1976) según se describe en Sambrook y Russell (2001).

Muestra	Preparación de la muestra	Procedimiento
Metal pesado	Sal metálica disuelta en tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8 a la concentración de metal requerida	Suspensión celular en tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8 al que se adiciona la sal metálica específica a una concentración final determinada
Otros agentes estresantes	Choque térmico de alta (42°C) o baja (4°C) temperatura, pH ácido (5) o básico (9), estrés oxidativo (PQ a 7,78 nM)	Suspensión celular sometido a la condición de estrés ambiental específica en tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8 o en medio PP210
Muestras naturales de suelo	Se prepara una suspensión de 1 g de la muestra en 10 ml de H ₂ O Milli Q que es incubada durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se elimina el material particulado de la suspensión acuosa centrifugando a 500 g, y el sobrenadante es filtrado a través de un filtro de tamaño de poro de 0,2 μ M	Cultivo celular en tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8 al que se adiciona la suspensión acuosa filtrada de la muestra ambiental. De este modo el biosensor es expuesto a una dilución 10 ⁻¹ de la suspensión acuosa, a menos que se indique lo contrario
Muestras naturales de agua	La muestra es filtrada a través de un filtro de tamaño de poro de 0,2 μ M	Cultivo celular en tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8 al que se adiciona la muestra de agua filtrada. De este modo el biosensor es expuesto a una dilución 10 ⁻¹ de la muestra, a menos que se indique lo contrario

Tabla 25. Procedimiento de preparación y exposición de los biosensores MTT1Luc y MTT5Luc a los distintos tipos de muestra analizadas.

La actividad enzimática luciferasa de cada muestra fue evaluada siguiendo el procedimiento descrito en el *Luciferase Assay Kit* (Promega). Para ello, en un vial se dispensaron 20 μ l de la muestra junto con 100 μ l del *Luciferase Assay Reagent* (Promega). La cantidad de luz emitida se midió durante 10 segundos empleando el luminómetro *Berthold LB 9509 Junior* (Berthold). Previamente se había comprobado que el ensayo era lineal en el rango de detección del luminómetro empleado, midiendo la actividad luciferasa en diluciones seriadas de un extracto celular de concentración de proteína conocida (datos no mostrados).

14.2 Cuantificación de actividad luciferasa *in vivo* a partir de células permeabilizadas al sustrato D-luciferina

Tras la exposición de las células al metal en tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8 tal y como se describió anteriormente, las células fueron centrifugadas a 500 g durante 2 minutos, y lavadas en una solución de DMSO al 0,20 % y Triton X-100 al 0,01%. Finalmente, el sedimento celular fue resuspendido en 500 μ l de esta solución.

En un vial se depositaron 20 μ l de esta suspensión celular y 100 μ l del *Luciferase Assay Reagent* (Promega) que contiene el sustrato D-luciferina. Tras esperar un minuto, se cuantificó la cantidad de luz emitida durante 10 segundos empleando el luminómetro *Berthold LB 9509 Junior* (Berthold), como se indicó en el apartado anterior.

14.3 Cuantificación de actividad luciferasa *in vivo* a partir de células sin permeabilizar

Tras la exposición de las células al metal en tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8 tal y como se describió anteriormente, las células fueron lavadas con tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8 (para eliminar los restos del metal), centrifugadas a 1.100 g durante 2 minutos, y el sedimento celular fue resuspendido en 500 μ l de este mismo tampón. Para valorar la actividad luciferasa, en un vial se depositaron 20 μ l de esta suspensión celular y 100 μ l del *Luciferase Assay Reagent* (Promega). Tras esperar un minuto se midió la cantidad de luz emitida durante 10 segundos.

15 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Los cultivos de *T. thermophila* (control y tratados con CdCl_2 $2,67 \times 10^{-5}$ M durante 4 días) fueron centrifugados a 500 g durante 3 minutos, lavados con tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8 EDTA 4 mM, liofilizados y almacenados a -80°C hasta su utilización. El líofo celular fue tratado con una solución compuesta por SSA 5 % (w/v) (Sigma) y DPTA 6,3 mM (Sigma) tal y como se describe en De Knecht *et al.* (1994). Tras la adición de TFA 5% (v/v) (Sigma), el extracto se dividió en alícuotas de 100 μ l que fueron analizadas por HPLC (Aqua C18 column, 250x4.6 mm; Phenomenex) empleando un gradiente de concentración lineal de acetonitrilo 0-0,2% (v/v) conteniendo ácido fosfórico 0,05 %, y a una velocidad de flujo de 1,5 ml/min (15 min tiempo total de análisis). Los tioles fueron detectados por derivatización con reactivo de Ellman (DTNB) (Sigma) y cuantificados mediante curvas de calibrado de GSH. Las condiciones de la cromatografía se optimizaron empleando como patrones GSH (Sigma), FQ_2 (Applichem) y los productos purificados de reacciones *in vitro* catalizadas por la enzima recombinante AtPCS1. El análisis mediante HPLC para la detección de fitoquelatinas en las muestras fue realizado por el Dr. Simone Ottonello y la Dra. Roberta Ruotolo, del *Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare*, de la *Università di Parma* (Italia).

16 PROGRAMAS INFORMÁTICOS EMPLEADOS

A continuación se citan los programas informáticos utilizados y las bases de datos consultadas en el presente trabajo de investigación. Las direcciones web a través de las cuales se puede acceder a los mismos se indican en las Tablas 22 y 23.

16.1 Búsqueda de similitud de secuencias. Alineamiento múltiple de secuencias y construcción de árboles filogenéticos

Para las búsquedas de similitud de secuencias se utilizó el programa *BLAST* (Altschul *et al.* 1997), las secuencias aminoacídicas inferidas de los genes de interés fueron comparadas con la base de datos de proteínas no redundante del NCBI, empleando el algoritmo *blastp* y la matriz que utiliza este algoritmo por defecto, *BLOSSUM62*. Las secuencias aminoacídicas inferidas de todos los genes utilizados en este trabajo están disponibles en la base de datos del NCBI. El número de acceso de cada una de ellas se indica en la Tabla A1.

Para alinear las diferentes secuencias aminoacídicas se utilizó el programa *T-Coffee* (*Tree-based Consistency Objective Function For alignmEnt Evaluation*) (Notredame *et al.* 2000), empleando los parámetros establecidos por defecto. Los alineamientos fueron visualizados mediante el programa *BoxShade v.3.21* del Instituto Suizo de Bioinformática. Cuando fue necesario, los alineamientos fueron editados manualmente empleando el programa informático *BioEdit v.7.0.9.0* (Hall 1999). La calidad de los alineamientos obtenidos se evaluó utilizando la herramienta *CORE* (Poirot *et al.* 2003).

La construcción de las matrices de identidad se llevó a cabo utilizando el programa *SIAS* a partir del alineamiento obtenido con el programa *TCoffee* (Notredame *et al.* 2000).

La obtención de diagramas de tipo LOGO (Crooks *et al.* 2004), para la visualización de los residuos más conservados en un alineamiento múltiple de secuencias se realizó con la herramienta informática *WebLOGO v.2.8.2*.

Los árboles filogenéticos fueron contruidos mediante diferentes métodos de inferencia filogenética: métodos basados en distancias filogenéticas (*Neighbor-Joining*, NJ; *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic*, UPGMA) y métodos basados en caracteres (*Bayesian Method*, MB; y *Maximum Likelihood*, ML). La inferencia según los métodos UPGMA Y NJ se realizó con el programa informático *PHYLP v3.67* (Felsenstein 1989; 2004), realizando 1000 réplicas (*bootstrap*) de cada árbol. La inferencia según el método de máxima verosimilitud (*Maximum Likelihood*, ML) se realizó con el programa informático *PhyML v.3.0* (Guindon y Gascuel 2003; Guindon *et al.* 2005) realizando 1000 réplicas (*bootstrap*). La inferencia según el método bayesiano (MB) se realizó con el programa informático *MrBayes v.3.1.2* (Ronquist y Huelsenbeck 2003) seleccionando el modelo *mixed protein*. Se corrieron 100.000 generaciones muestreando los árboles producidos cada 100 generaciones. El análisis finalizó cuando la desviación típica obtenida era menor de 0,01. A partir de los distintos árboles obtenidos se construyó un árbol

consenso. El porcentaje de los árboles que coinciden en cada nodo se indica con un número denominado como “probabilidad posterior” (*posterior probability*). Para la selección del modelo evolutivo empleado en la construcción de cada árbol se utilizó el programa informático *ProtTest v.1.4* (Abascal *et al.* 2005). Los árboles fueron representados y visualizados mediante la herramienta informática *NJPlot v.2.2* (Perriere y Gouy 1996).

16.2 Búsqueda de motivos, patrones o dominios conservados en secuencias nucleotídicas o aminoacídicas

Para la búsqueda y detección de motivos conservados relacionados con la regulación de la expresión génica en las regiones 5'UTR y 3'UTR de los genes analizados en este trabajo, se utilizaron los programas informáticos *MEME v.4.0* (Bailey y Elkan 1994) y *Gibbs Sampler* (Neuwald *et al.* 1995), con los parámetros establecidos por defecto.

Para la búsqueda de motivos degenerados identificados en otros organismos se utilizó el programa *DNA pattern find*, con los parámetros establecidos por defecto.

Para búsqueda de patrones y dominios conservados en la secuencia aminoacídica inferida de los genes analizados se utilizaron diferentes bases de datos: *Conserved Domain* del NCBI, *Pfam* del Instituto Sanger, *Prosite* del Instituto Suizo de Bioinformática e *Interpro* del EMBL.

16.3 Búsqueda de ESTs en TDB, PDB y UNIGENE

La presencia de transcritos de determinados genes de *T. thermophila* y *P. tetraurelia* en librerías de expresión se analizó a través de las bases de datos de ambos ciliados (*Tetrahymena Genome Database*, TGD; *Tetrahymena Genome Expresión Database*, TGED; *Paramecium Database*, PDB) y la base de datos *UNIGENE* del NCBI.

16.4 Análisis de estructura primaria y predicción de estructuras 2D y 3D de ácidos nucleicos y proteínas

Para el análisis de la estructura primaria de las proteínas utilizadas en este trabajo se utilizaron distintas herramientas disponibles en el servidor *Expasy* (*Expert Protein Analysis System*) del Instituto Sueco de Bioinformática (SIB).

Para la predicción de los dominios *coiled-coil* en la secuencia aminoacídica de una proteína se utilizó el programa informático *Coils* (Lupas *et al.* 1991). La estructura secundaria de una secuencia aminoacídica fue inferida mediante el programa PSIPRED (Jones 1999; Bryson *et al.* 2005).

Para la predicción de estructuras tridimensionales de proteínas se utilizó el programa informático *Phyre v0.2* (Kelley y Sternberg 2009).

Para la predicción de la estructura adoptada tras el plegamiento de una molécula de ARN se utilizó el programa informático *RNA & DNA folding* (Zuker 2003).

16.5 Diseño de cebadores y otras secuencias de oligonucleótidos

Las parejas de cebadores empleadas para las PCR estándar fueron diseñados con el programa *Vector NTI TM Suite v.9* (Invitrogen), mientras que para el diseño de los cebadores empleados en la RT-PCR cuantitativa se utilizó el programa informático *Primer Express v2.0* (Applied Biosystems).

16.6 Análisis estadístico

Para determinar si las diferencias entre la expresión génica debida a un tipo de estrés y la debida a su expresión basal son significativas se realizó test estadístico *Test de Randomisation* que utiliza el programa informático *REST* (Pfaffl *et al.* 2002).

Programa informático	Página web de acceso	Aplicación
BioEdit v.7.0.9.0	http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html	Edición de alineamiento múltiple de secuencias
BoxShade v.3.2.1	http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html	Visualización de alineamiento múltiple de secuencias
Coils	http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html	Predicción de regiones <i>Coiled coil</i> en proteínas
CORE	http://www.tcoffee.org/	Evaluación de un alineamiento múltiple de secuencias
DNA pattern find	http://www.bioinformatics.org/sms2/dna_pattern.html	Búsqueda de motivos conservados en secuencias nucleotídicas
Gibbs Sampler	http://bayesweb.wadsworth.org/gibbs/gibbs.html	Búsqueda de motivos conservados en secuencias nucleotídicas
MEME v.4.0	http://meme.sdsc.edu/meme/	Búsqueda de motivos conservados en secuencias nucleotídicas
Mr Bayes v.3.1.2	http://mrbayes.net	Construcción de árboles filogenéticos mediante el método de inferencia bayesiano
Njplot v2.2	http://pbil.univ-lyon1.fr/software/njplot.html	Visualización de árboles filogenéticos
PHYMLIP v.3.67	http://bioweb2.pasteur.fr/phylogeny/intro-en.html	Construcción de árboles filogenéticos mediante el método de inferencia basado en distancias filogenéticas
PhyML v.3.0	http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/	Construcción de árboles filogenéticos mediante el método de inferencia de máxima probabilidad
Phyre	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/	Predicción de la estructura tridimensional de una proteína
ProtTest v.1.4	http://darwin.uvigo.es/software/modeltest.html	Selección de modelos evolutivos
PSIPRED	http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/	Predicción de estructura secundaria de una secuencia aminoacídica
Randomisation Pairwise Test	http://www.bioss.ac.uk/smart/unix/mrandt/slides/frames.htm	Análisis estadístico
RNA & DNA holding	http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/	Predicción de estructuras tras el plegamiento de una molécula de ADN o ARN
SIAS	http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html	Obtención de matrices de identidad de secuencia
TCoffee	http://www.tcoffee.org/	Alineamiento múltiple de secuencias
WebLOGO v.2.8.2	http://weblogo.berkeley.edu/	Visualización alineamiento múltiple de secuencias

Tabla 22. Direcciones web de los principales programas informáticos utilizados.

Bases de Datos y Programas de búsqueda en Bases de datos	Página web de acceso	Aplicación
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/	Búsqueda de secuencias similares
Expasy	http://www.expasy.ch/	Servidor de múltiples herramientas para el análisis de proteínas
InterProScan EMBL	http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/	Búsqueda de motivos, dominios o patrones conservados en secuencias aminoacídicas
MotifScan	http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan	Búsqueda de motivos, dominios o patrones conservados en secuencias aminoacídicas
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	Base de datos de secuencias, publicaciones científicas y diversas herramientas biotecnológicas
Conserved Domain NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi	Búsqueda de motivos, dominios o patrones conservados en secuencias aminoacídicas
ScanProsite	http://www.expasy.org/tools/scanprosite/	Búsqueda de motivos, dominios o patrones conservados en secuencias aminoacídicas
PDB	http://paramecium.cgm.cmr-gif.fr/	Base de datos del genoma macronuclear secuenciado de <i>P. tetraurelia</i>
SMART	http://smart.embl-heidelberg.de/	Búsqueda de motivos, dominios o patrones conservados en secuencias aminoacídicas
TGD	http://www.ciliate.org/	Base de datos del genoma macronuclear secuenciado de <i>T. thermophila</i>
TGED	http://tged.ihb.ac.cn/	Base de datos de expresión de genes de <i>T. thermophila</i>
UNIGENE	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=unigene	Base de datos de expresión de genes

Tabla 23. Direcciones web de las principales bases de datos consultadas.

Resultados

A. CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE METALOTIONEÍNAS EN *Tetrahymena*

A.1 Aislamiento y caracterización estructural de nuevos genes codificantes para metalotioneínas (MTs) en *Tetrahymena*: *TtheMTT5*, *TrosMTT1* y *TrosMTT2*

A.1.1 Aislamiento y caracterización estructural del gen *MTT5* de *T. thermophila* (*TtheMTT5*)

La existencia del gen *MTT5* fue detectada tras buscar secuencias homólogas a las metalotioneínas (MTs) previamente conocidas de *T. thermophila* en el genoma macronuclear secuenciado de este ciliado. A partir de la presumible secuencia codificante se diseñó la pareja de cebadores específicos MTT5A/MTT5B (Tabla 10) para amplificar por PCR estándar el ORF correspondiente completo, a partir de ADN genómico del ciliado (Figura 13 A).

Este gen reside en el la región ensamblada (scaffold) 8354577, y está situado en el cromosoma telocéntrico micronuclear número 5. La región codificante presenta una longitud de 297 pb (Figura 13 B), y da lugar a una proteína de 99 aminoácidos, siendo así la Cd-MT putativa más corta del género *Tetrahymena*, con una masa molecular estimada de 10,6 kDa.

La secuencia codificante de *TtheMTT5* se obtuvo también como ADNc aislado a partir de ARN de un cultivo tratado con Cd durante 24 horas (Nº Acc. DQ517936). El alineamiento de la secuencia de ADNc con la genómica reveló la ausencia de intrones en la secuencia codificante (ORF).

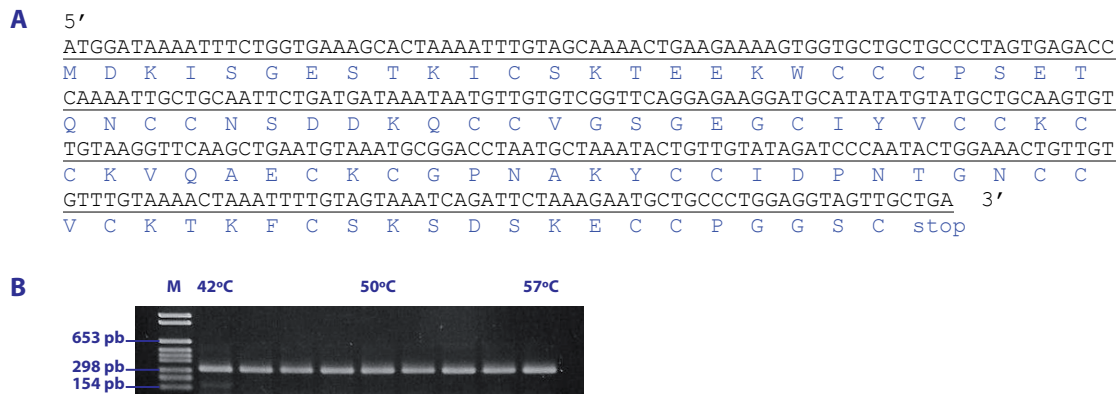


Figura 13. Región codificante (ORF) del gen *MTT5* de *T. thermophila*. **(A):** Secuencia nucleotídica y aminoácida inferida (código IUPAC de una letra). La región codificante presenta una longitud de 297 pb, y da lugar a una proteína de 99 aminoácidos. **(B):** Secuencia codificante del gen *TtheMTT5* amplificada por PCR en gradiente de temperatura a partir de ADN genómico, empleando los cebadores MTT5A/MTT5B.

A.1.2 Aislamiento y caracterización estructural de los genes *MTT1* y *MTT2* de *T. rostrata* (*TrosMTT1* y *TrosMTT2*)

Una vez conocida todos los genes codificantes de putativas Cd-MTs (*TtheMTT1*, *TtheMTT3* y *TtheMTT5*) en el ciliado *T. thermophila*, nos propusimos analizar si existen genes similares en otras especies del género *Tetrahymena*.

Para la búsqueda de genes codificantes de MTs en el genoma macronuclear no secuenciado del ciliado *T. rostrata* se emplearon las parejas de cebadores MET1/MET 2 y MTCU1/MTCU2 (Tabla 10), diseñadas en base a las secuencias de los genes *TpyrMT-1* (Cd-MT) (Nº Acc. AJ005080) y *TtherMTT2* (Cu-MT) (Nº Acc. AY204351) respectivamente. Dichos cebadores amplificaron mediante PCR estándar un fragmento de 300 y 225 pb respectivamente (Figura 14, A y E), que presentaban homología con genes de Cd-MTs o Cu-MTs de *Tetrahymena*. La secuencia codificante completa de ambos genes se obtuvo mediante las técnicas de 5' y 3' RACE, a partir de ARN aislado de cultivos del ciliado expuestos a Cd o Cu durante 24 horas. (Figura 14, B, C y F). Estos dos genes han sido denominados *TrosMTT1* y *TrosMTT2* respectivamente. El alineamiento entre las secuencias obtenidas a partir de ADN genómico y ADNc reveló que ninguna de las secuencias codificantes de estos genes presenta intrones.

La secuencia de ADNc del gen *TrosMTT1* obtenida (Nº Acc. EU627174) presentó una longitud de 522 pb; compuesta por un ORF de 342 pb, una región 5'UTR de 64 pb, y una región 3'UTR de 116 pb. Ambas regiones no codificantes mostraban un alto contenido en A-T (82 y 87 % respectivamente). En la región 3'UTR se identificó una posible señal similar a la señal consenso de poliadenilación (ATTAAG) en eucariotas, y dos señales de degradación rápida de ARNm (ATTAA) descritas en genes de mamíferos (Shaw y Kamen 1986). Además, la molécula de ADNc presentaba una cola poliA situada a 91 pb del codon stop (Figura 14, D). Este gen codifica para una proteína de 113 aminoácidos, con una masa molecular inferida de 11,5 kDa.



Figura 14. Genes *TrosMTT1* (Nº. Acc. EU627174) y *TrosMTT2* (Nº. Acc. EU627175). **(A y E):** Fragmento amplificado por PCR estándar a partir de ADN genómico total de *T. rostrata*, empleando las parejas de cebadores MET1/MET2 (carril A1) y MTCU1/MTCU2 (carril E2). **(B y F):** Fragmento amplificado por 3' RACE a partir de ARN aislado de un cultivo expuesto durante 24 horas a Cd $4,45 \times 10^{-5}$ M (carril B1) o Cu $3,15 \times 10^{-4}$ M (carril F2), y empleando los cebadores MET1 (carril B1) y MTCU3 (carril F2), respectivamente. **(C):** Fragmento amplificado por 5' RACE a partir de ARN aislado de un cultivo expuesto durante 24 horas a Cd, y empleando el cebador MTT1TRB (carril C1). Cada fragmento fue clonado en el plásmido pCR2.1TOPO (Invitrogen) (banda superior carriles B1 y C1). **(D y G):** Secuencias nucleotídicas de los ADNc de *TrosMTT1* y *TrosMTT2*, se incluye parte de las regiones 5' y 3' UTR. La región aminoacídica inferida (código IUPAC de una letra) aparece en azul bajo la secuencia codificante (ORF) subrayada. Se incluyen además las potenciales señales de degradación de ARNm (amarillo) y polidenilización (púrpura) descritas en otros genes de *Tetrahymena*, y la localización de la cola poliA que presentaron las moléculas de ADNc aisladas.

La secuencia de ADNc del gen *TrosMTT2* obtenida (Nº Acc. EU627175) presentó una longitud de 398 pb. Está compuesta por un ORF de 237 pb, y una región 3'UTR de 161 pb rica en A-T (83 %). En la región 3'UTR aparecen tres posibles señales de poliadenilación (ATTAAG) y dos de degradación de ARNm (ATTAA) de eucariotas, y una cola poliA situada a 143 pb del codon stop. (Figura 14, G). Este gen codifica para una proteína de 78 aminoácidos con una masa molecular estimada de 8,2 kDa, siendo así la metalotioneína más corta descrita en ciliados.

A.2 Caracterización estructural de las proteínas inferidas de los genes *TtheMTT5*, *TrosMTT1* y *TrosMTT2*

La proteína inferida TtheMTT5 presenta 99 aminoácidos y una masa molecular estimada de 10,6 KDa. Contiene 24 residuos de cisteína (Cys) (24,2 % del total de aminoácidos), que se distribuyen en diferentes motivos. Además de los motivos CC y CXC, típicos de las MTs de vertebrados, en la secuencia aminoacídica de TtheMTT5 aparece el motivo CCC típico de las Cd-MTs de ciliados (Gutiérrez *et al.* 2009) (Figura 13). Comparte un alto porcentaje de identidad de secuencia con otras Cd-MTs del género *Tetrahymena* (68,6 % con TrosMTT1, 62,8 % con TpigMT-1), mientras que con las Cu-MTs el porcentaje de identidad no supera el 40 % (Figura 15). Como el resto de MTs de ciliados, y a diferencia de las MTs de vertebrados, TtheMTT5 contiene aminoácidos aromáticos (1 Phe, 1 Trp y 2 Tyr). Al igual que las MTs de vertebrados, tampoco presenta residuos de His en su secuencia (Figura 13).

La secuencia aminoacídica de TrosMTT1 (113 aminoácidos, 11,5 kDa) contiene 34 re-

siduos de Cys (30,1 % del total de aminoácidos), distribuidos en diferentes motivos (4 CCC, 2 CXCC, 6 CCX y 2 CXC) (Figura 14). Presenta un alto porcentaje de identidad (62,3-81,2 %) con ciertas Cd-MTs del género *Tetrahymena* (Figura 15). Al igual que las MTs de vertebrados, TrosMTT1 tampoco presenta aminoácidos aromáticos ni residuos de histidina en su secuencia.

La proteína TrosMTT2 (78 aminoácidos, 8,2 kDa) presenta 22 residuos de Cys (28,2 % del total) organizados en 9 motivos CXC, 1 CCX y 2 XXCXX (Figura 14). Muestra un alto porcentaje de identidad (75-86,38 %) con Cu-MTs del género *Tetrahymena* (Figura 15). Como el resto de Cu-MTs de *Tetrahymena* no contiene motivos CCC. Tampoco presenta aminoácidos aromáticos ni residuos de histidina en su secuencia.

Figura 15. Matriz de identidad (%) de secuencia entre las MTs del género *Tetrahymena* actualmente conocidas. A partir del alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas construido con el programa *T-Coffee*, se calculó la identidad entre las distintas MTs tal y como se describe en el apartado 16.1 de MYM. Tpig: *T. pigmentosa*. Tpyr: *T. pyriformis*. Tros: *T. rostrata*. Tthe: *T. thermophila*, Ttro: *T. tropicalis*.

		Cd-MTs								Cu-MTs			
		TpigMT-1	TpyrMT-1	TpyrMT-2	TrosMTT1	TtheMTT1	TtheMTT3	TtheMTT5	TtroMTT1	TpigMT-2	TrosMTT2	TtheMTT2	TtheMTT4
Cd-MTs	TpigMT-1	100	38,2	29,8	81,2	55,5	44,5	62,8	60,7	24,1	33,5	23,6	23,6
	TpyrMT-1		100	41,4	38,2	60,7	52,4	30,9	58,6	37,2	37,2	38,2	38,2
	TpyrMT-2			100	28,8	51,8	48,2	22,5	50,3	16,8	17,3	17,8	17,8
	TrosMTT1				100	62,3	50,3	68,6	65,4	31,4	39,8	26,7	26,7
	TtheMTT1					100	79,6	45	81,2	24,1	24,1	24,6	24,6
	TtheMTT3						100	39,3	66,5	23,6	23	23	23
	TtheMTT5							100	45	29,8	39,6	24,1	24,1
	TtroMTT1								100	27,7	27,7	25,1	25,1
Cu-MTs	TpigMT-2									100	86,4	78,5	79,1
	TrosMTT2										100	74,9	75,9
	TtheMTT2											100	99
	TtheMTT4												100

A.3 Alineamiento múltiple y análisis filogenético de secuencias de MTs de *Tetrahymena*

A.3.1 Clasificación de las metalotioneínas del género *Tetrahymena* en dos subfamilias: subfamilia 7a (Cd-MTs) y subfamilia 7b (Cu-MTs)

Aplicando el programa informático *T-Coffee* (Notredame *et al.* 2000) se alinearon las secuencias aminoacídicas inferidas de los genes *TtheMTT5*, *TrosMTT1* y *TrosMTT2* con las del resto de MTs descritas hasta ahora en el género *Tetrahymena* (Figura 16). El alineamiento muestra que las MTs de *Tetrahymena* se distribuyen en dos grupos fácilmente distinguibles por el patrón de agrupación de los residuos de Cys. En el primer grupo, la mayoría de las Cys se organizan en motivos de dos o tres Cys consecutivas (CCC y CCX). Por el contrario, el segundo grupo prácticamente no presenta Cys adyacentes (excepto un motivo CCX que presentan TrosMTT2 y TpigMT-2). Hay además otra diferencia estructural entre los dos grupos: la distribución en la secuencia de las Lys (K) y Cys (C). En el segundo grupo la mayoría de las Lys aparecen flanqueadas por dos Cys, al igual que ocurre en las MTs de mamíferos. En cambio, en el primer grupo esta distribución es menos habitual (Figura 16).

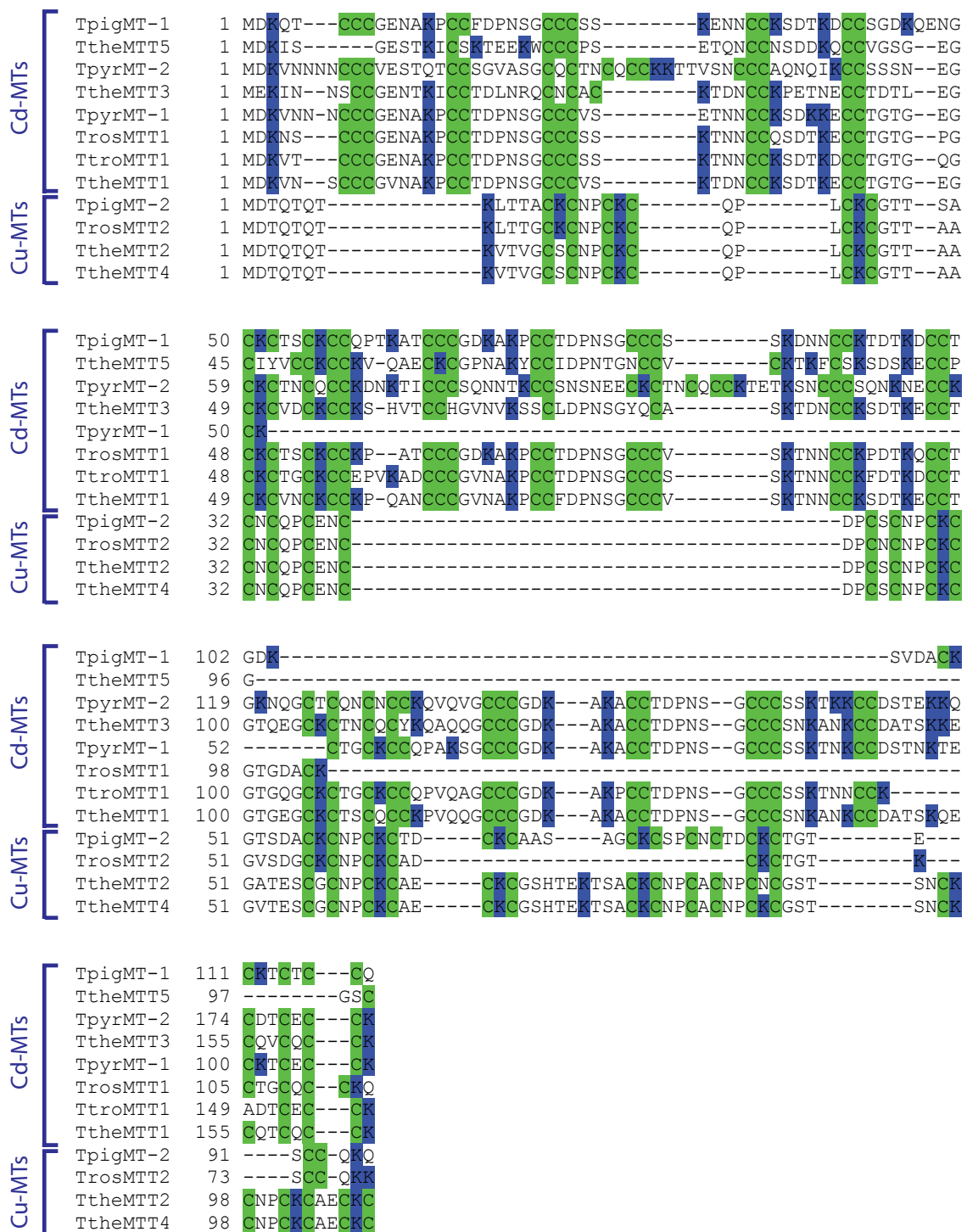


Figura 16. Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de las MTs del género *Tetrahymena* conocidas actualmente. Las doce secuencias aminoacídicas fueron alineadas empleando el programa informático *T-Coffee*. En verde se destacan los residuos de cisteína (C) y en azul los residuos de lisina (K). Los números representan la posición del primer aminoácido en cada línea. Tpig: *T. pigmentosa*. Tpyr: *T. pyriformis*. Tros: *T. rostrata*. Tthe: *T. thermophila*. Ttro: *T. tropicalis*. Las ocho primeras secuencias corresponden a la subfamilia 7a (Cd-MTs), mientras que las cuatro últimas pertenecen a la subfamilia 7b (Cu-MTs), como se explica en el texto.

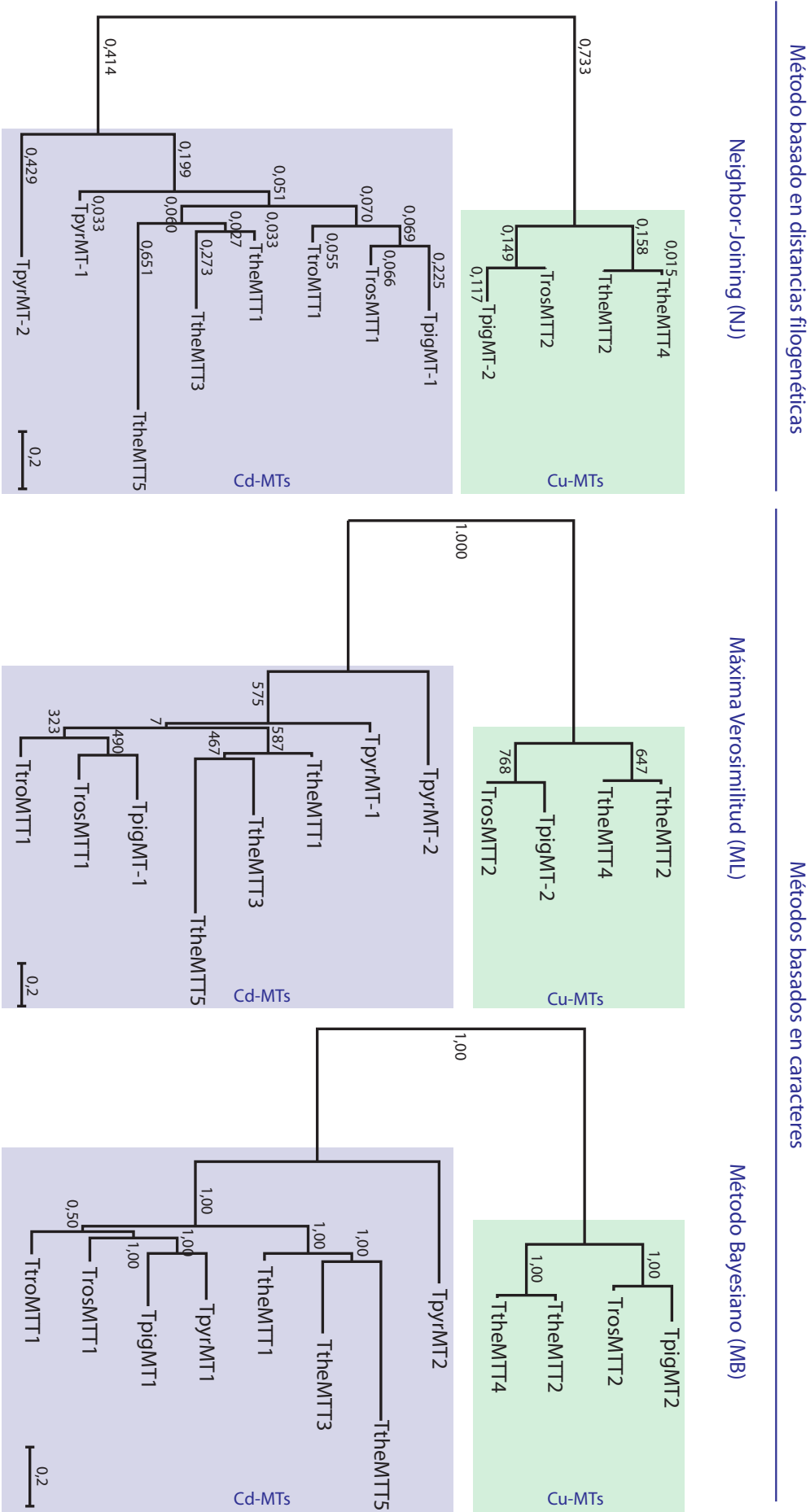


Figura 17. Árboles filogenéticos de todas las MTs descritas en el género *Tetrahymena*. Los tres árboles fueron contruidos a partir del mismo alineamiento múltiple de secuencias (Figura 16), pero empleando distintos métodos de inferencia filogenética: Neighbor-Joining (NJ), Máxima Verosimilitud (ML) y el Método Bayesiano (MB) respectivamente. En los nodos de cada árbol se indica la distancia filogenética (NJ), los valores de bootstrap (ML), o la probabilidad de que cada rama sea correcta (MB). El cuadro púrpura agrupa a la subfamilia 7a (Cd-MTs) y el verde a la subfamilia 7b (Cu-MTs). Tpigm: *T. pigmentosa*. Tpyr: *T. pyriformis*. Tros: *T. rostrata*. Tthe: *T. thermophila*. Ttro: *T. tropicalis*.

A partir del alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de MTs, se construyó un árbol filogenético aplicando el método de máxima verosimilitud (ML, *Maximum Likelihood*) (apartado 16.1 de MYM) (Figura 17). En él aparecen dos grupos de MTs claramente diferenciados, que coinciden con los dos grupos que establecimos en el apartado anterior según el patrón de distribución de las Cys. Para analizar la fiabilidad de dicho árbol, se comparó con el obtenido empleando otros métodos de inferencia filogenética (NJ y MB), obteniéndose árboles muy similares (Figura 17). Estos árboles corroboran la clasificación de las MTs de *Tetrahymena* en los dos grupos previamente establecidos según caracteres estructurales. La probabilidad de que estos dos grupos estén correctamente separados es del 99,9 % (valor de *bootstrap* 0,999 para el árbol ML) al 100 % (probabilidad 1,0 para el MB) según el tipo de árbol (Figura 17).

A.3.2 Estructura modular de las MTs de *Tetrahymena*

La secuencia aminoacídica de las 8 MTs de la subfamilia 7a (Cd-MTs) está compuesta por segmentos o módulos que llevan el motivo CXCK en posición C-terminal, con algunas excepciones. Los módulos (27-54 aa de longitud) están separados por segmentos de 3-8 aminoácidos que denominamos “linkers” (o uniones entre módulos). Así TpyrMT-1, TtheMTT5, TrosMTT1 y TpigMT-1 tienen una estructura bimodular, TtheMTT1, TtheMTT3 y TrosMTT1 están compuestas por tres módulos, y TpyrMT-2 presenta 5 módulos (Figura 18).

CdMT	Módulo	Linker	Submódulo Tipo 1	Submódulo Tipo 1	Submódulo Tipo 2	Longitud
TpyrMT-1	mod 1	MD--VN	CCGGENAKPCCTDPNSG	CCCVSETNNCCSDDKE	CCTGTGEG--CKGTGCKCCQ	52
TtheMTT1	mod 1	MD--VN	CCGGVNAKPCCTDPNSG	CCCVSTDNCCSDDTKE	CCTGTGEG--CKGVNCKCCQ	52
TtheMTT1	mod 2	---PQAN	CCGGVNAKPCCFDPNSG	CCCVSTNNCCSDDTKE	CCTGTGEG--CKGTSCKCCQ	52
TrosMTT1	mod 1	MD--VNS	CCGGENAKPCCTDPNSG	CCCVSTNNCCSDDTKE	CCTGTGPG--CKGTSCKCCQ	52
TrosMTT1	mod 2	----PAT	CCGGDNAKPCCTDPNSG	CCCVSTNNCCCPDTRQ	CCTGTGDA--CKGTGCKCCQ	53
TpygMT-1	mod 1	MD--VQT	CCGGENAKPCCFDPNSG	CCCVSTNNCCSDDTKE	CCTGTGEG--CKGVNCKCCQ	54
TpygMT-1	mod 2	---PTAT	CCGGDNAKPCCTDPNSG	CCCVSTNNCCCPDTRQ	CCTGTGDA--CKGTGCKCCQ	54
TtroMTT1	mod 1	MD--VVT	CCGGENAKPCCTDPNSG	CCCVSTNNCCSDDTKE	CCTGTGEG--CKGVNCKCCQ	52
TtroMTT1	mod 2	---PVAD	CCGGVNAKPCCTDPNSG	CCCVSTNNCCSDDTKE	CCTGTGEG--CKGVNCKCCQ	52
TtheMTT3	mod 1	ME--INN	SCGGENTKICCTDLNRQ	CCCVSTNNCCCPETNE	CCTDTLEG--CKGVNCKCCQ	52
TtheMTT3	mod 2	---SVT	CCGVNVKSSOLDPNSG	CCCVSTNNCCSDDTKE	CCTGTGEG--CKGVNCKCCQ	52
TtheMTT5	mod 1	MD--VIS	---GESTKISSTEEFW	CCCVSTNNCCSDDTKE	CCTGTGEG--CKGVNCKCCQ	49
TtheMTT5	mod 2	---VQAE	CCGVNVKSSOLDPNSG	CCCVSTNNCCSDDTKE	CCTGTGEG--CKGVNCKCCQ	41
TpyrMT-2	mod 1a	MD--VN	CCGVNVKSSOLDPNSG	CCCVSTNNCCSDDTKE	CCTGTGEG--CKGVNCKCCQ	27
TpyrMT-2	mod 1b	---TTVSN	CCGVNVKSSOLDPNSG	CCCVSTNNCCSDDTKE	CCTGTGEG--CKGVNCKCCQ	27
TpyrMT-2	mod 1c	---DNNTI	CCGVNVKSSOLDPNSG	CCCVSTNNCCSDDTKE	CCTGTGEG--CKGVNCKCCQ	27
TpyrMT-2	mod 1d	---TETISN	CCGVNVKSSOLDPNSG	CCCVSTNNCCSDDTKE	CCTGTGEG--CKGVNCKCCQ	27
TtheMTT1	mod 3	---PVQAG	CCGVNVKSSOLDPNSG	CCCVSTNNCCSDDTKE	CCTGTGEG--CKGVNCKCCQ	43
TtheMTT1	mod 3	---PVQAG	CCGVNVKSSOLDPNSG	CCCVSTNNCCSDDTKE	CCTGTGEG--CKGVNCKCCQ	37
TtheMTT3	mod 3	---PVQAG	CCGVNVKSSOLDPNSG	CCCVSTNNCCSDDTKE	CCTGTGEG--CKGVNCKCCQ	43
TpyrMT-1	mod 2	---PVS	CCGVNVKSSOLDPNSG	CCCVSTNNCCSDDTKE	CCTGTGEG--CKGVNCKCCQ	43
TpyrMT-2	mod 2	---PVQAG	CCGVNVKSSOLDPNSG	CCCVSTNNCCSDDTKE	CCTGTGEG--CKGVNCKCCQ	43

Consenso X₄₋₈ C₃X₆C₂X₆ C₃X₆C₂X₆ C₂X₆ + CXCX₂CX₂X₁₋₂

Figura 18. Estructura modular de las MTs de la subfamilia 7a (Cd-MTs). Con colores se indican los residuos conservados de Cys (C, verde), Lys (K, azul), Gln (Q, amarillo) e His (H, rosa). Tpig: *T. pigmentosa*. Tpyr: *T. pyriformis*. Tros: *T. rostrata*. Tthe: *T. thermophila*. Ttro: *T. tropicalis*.

En estos módulos la posición de las Cys está muy conservada. Además, estos módulos están compuestos por 2 tipos de submódulos: submódulos de tipo 1 (C₃X₆C₂X₆) y un submódulo de tipo 2 (C₂X₆₋₈CX₂CX₂X₁₋₂; donde la última X es K (71,4 %), Q (23,8 %) o E (4,7 %)). En la mayoría de los casos los módulos están formados por 2 submódulos tipo 1 y 1 submódulo tipo

2 (Figuras 18 y 19), aunque hay excepciones, como TpyrMT-2 que presenta 4 módulos compuestos sólo por 1 submódulo tipo 1, y medio submódulo tipo 2. El segundo o tercer módulo de varias Cd-MTs presenta 2 submódulos tipo 1 y medio submódulo tipo 2.

Aunque las Cu-MTs de *Tetrahymena* no presentan una estructura modular tan clara, el alineamiento de las secuencias muestra también una posible organización basada en repeticiones del motivo CKCX₂₋₅CXC (donde K puede ser sustituido a veces por otro aminoácido) (Figura 20).

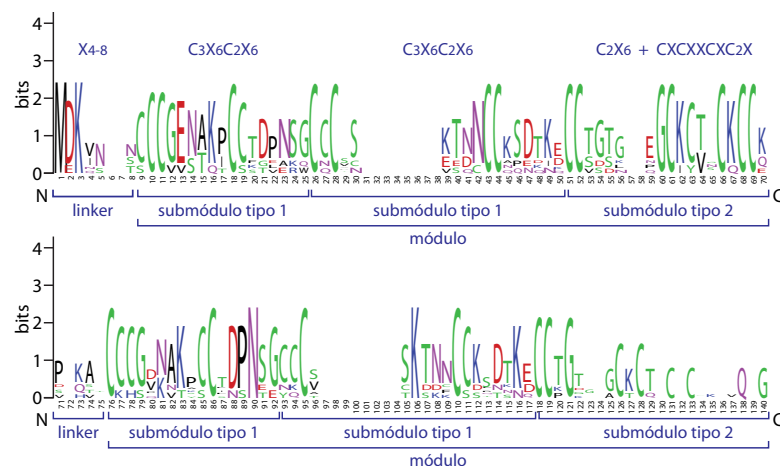


Figura 19. Representación LOGO de los aminoácidos conservados en la estructura modular de las Cd-MTs del género *Tetrahymena*. El tamaño de cada letra representa el nivel de conservación de cada residuo. Las columnas del logo en que no aparece ninguna letra se deben a que en esa posición del módulo la conservación de residuos es mínima.

TpigMT-2	1	MDTQTQTKLTTACKCNPCKCQPLCKCGTTTACNCQPCENCDCPCSCNPCKCGTSDACKCNP
TtheMTT2	1	MDTQTQTQKTVGSCNPCKCQPLCKCGTTAACNCQPCENCDCPCSCNPCKCGATESCGCNP
TtheMTT4	1	MDTQTQTQKTVGSCNPCKCQPLCKCGTTAACNCQPCENCDCPCSCNPCKCGVTESCGCNP
TrosMTT2	1	MDTQTQTKLTTGCKCNPCKCQPLCKCGTTAACNCQPCENCDCPCSCNPCKCGVSDGCKCNP

TpigMT-2	61	CKCTDCKCAA-----SAGCKCSPCNCTDCKCTGTESCC-----QKQ
TtheMTT2	61	CKCAECKCGSHTEKTSACKCNPACNPNCGSTSNCKCNPCKCAECKC
TtheMTT4	61	CKCAECKCGSHTEKTSACKCNPACNPNCKGTSNCKCNPCKCAECKC
TrosMTT2	61	CKCADCKCT-----GTKSCC-----QKQ

Figura 20. Alineamiento múltiple de secuencias de Cu-MTs del género *Tetrahymena*. Tpig: *T. pigmentosa*. Tros: *T. rostrata*. Tthe: *T. thermophila*. Los aminoácidos idénticos se indican con fondo oscuro.

A.4 Análisis de la expresión de genes de MTs de *Tetrahymena* bajo diferentes situaciones de estrés

A.4.1 Análisis comparativo de la expresión de los genes *MTT1*, *MTT3* y *MTT5* de *T. thermophila* (*TtheMTT1*, *TtheMTT3* y *TtheMTT5*)

Los niveles de expresión de los tres genes codificantes para cada una de las Cd-MTs de *T. thermophila* bajo diferentes condiciones de estrés (Tabla 8) fueron analizados mediante RT-PCR cuantitativa (RT-PCRq). Dado que estos genes se expresan también de forma constitutiva (Díaz *et al.* 2007), se determinó la expresión relativa de cada gen respecto a los niveles basales (cultivo control no tratado, cuyo nivel de expresión se fija como 1). En la Figura 21 se muestran los niveles de expresión respecto al control no tratado, y normalizados respecto al gen de expresión constitutiva codificante de la α -tubulina 1 (*ATU1*; N° Acc. M86723). Todos los metales ensayados inducen la expresión de los tres genes, a excepción del Ni y el Cu, para los que la

expresión de los tres genes es similar a los niveles basales (Figura 21). El Cu sólo induce la expresión de *TtheMTT5* (2,4 veces los niveles basales, $p < 0,05$) tras 1 h de exposición. *TtheMTT5* es el gen más inducible de los tres, siendo el que mayores niveles de expresión presenta en todos los tratamientos ensayados, y el que responde a mayor número de agentes estresantes. En general, *TtheMTT1* y *TtheMTT3* presentan un patrón de inducción similar, aunque *TtheMTT3* suele alcanzar menores niveles de expresión, excepto para la exposición al Zn durante 1 h, que induce la expresión de *TtheMTT3* (~14 veces, $p < 0,05$) a mayores niveles que la de *TtheMTT1* (~9 veces, $p < 0,05$) (Figura 21, A y B).

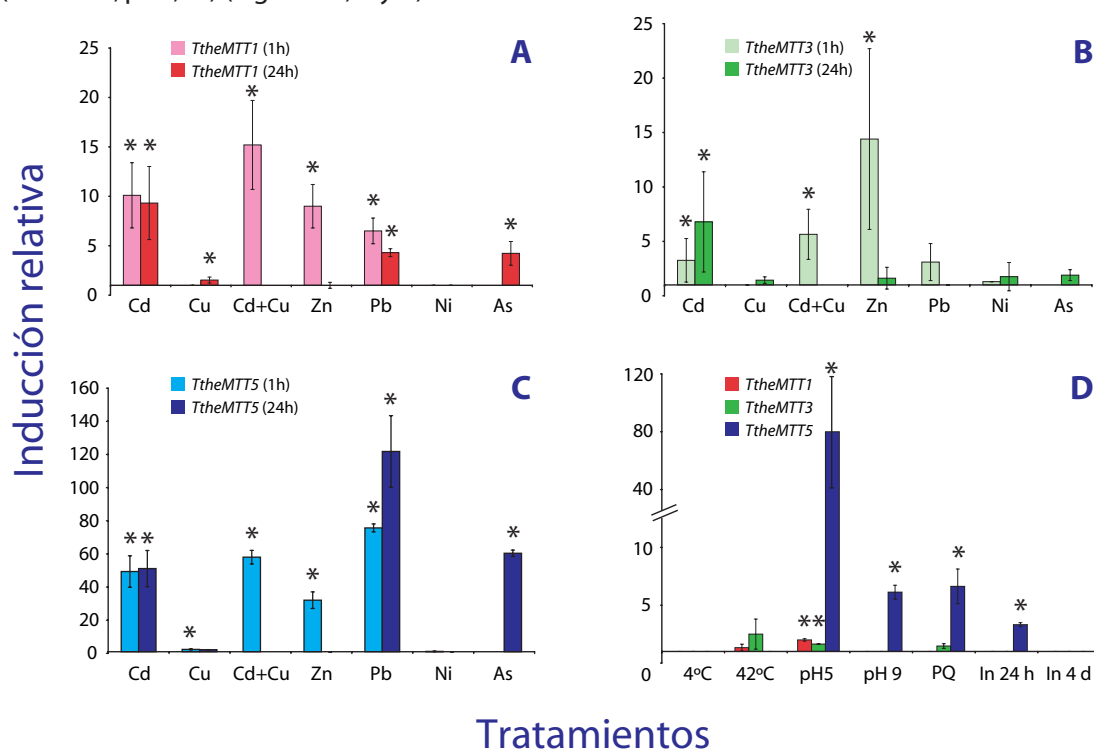


Figura 21. Análisis mediante RT-PCR cuantitativa de la expresión de los genes *MTT1*, *MTT3* y *MTT5* de *T. thermophila* bajo diferentes situaciones de estrés. **(A, B y C):** Nivel de inducción relativa respecto al control no tratado de los tres genes tras la exposición de las células a distintos metales pesados durante 1 h (barras claras) o 24 h (barras oscuras). **(D):** Nivel de inducción de los tres genes tras la exposición de las células a distintos agentes estresantes: baja (4°C) y alta (42°C) temperatura durante 2 h, pH ácido y básico durante 24 h, Paraquat (PQ) durante 24 h, y ausencia de nutrientes o inanición (In) durante 24 h o 4 días. Las barras representan el nivel de expresión relativa respecto al cultivo control no tratado (valor 1), y normalizados respecto a la expresión del gen constitutivo *ATU1* (α -tubulina). Cada barra corresponde al valor medio \pm la desviación estándar de dos experimentos independientes. Los asteriscos indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto al control. Las concentraciones de metales empleadas así como las condiciones de cada tratamiento se indican en la Tablas 8 y 9.

El Cd es uno de los mejores inductores de la expresión de los genes *TtheMTT1* (~10 veces, $p < 0,05$) y *TtheMTT5* (~50 veces, $p < 0,05$). Los mayores niveles de expresión de *TtheMTT1* y *TtheMTT3* se alcanzan tras la exposición de las células a Cd (o la mezcla Cd+Cu) y Zn respectivamente, y la inducción es estadísticamente significativa ($p < 0,05$) respecto a la expresión basal en todos los casos. Los máximos niveles de expresión del gen *TtheMTT5* se alcanzan con el Pb (~75-122 veces, $p < 0,05$), Cd (~50 veces, $p < 0,05$), As (~60 veces, $p < 0,05$) y la mezcla Cd+Cu (~58 veces, $p < 0,05$). Como refleja la Figura 21, los tres genes se inducen preferentemente más por Cd o Zn que por Cu, ratificando la clasificación de estas tres isoformas como Cd-MTs (apartado A3.1 de R).

En general, ante una exposición a metales corta (1 h) o larga (24 h) parece que el patrón de inducción de cada gen es similar, excepto para el Zn (el nivel de inducción de los tres genes es superior tras 1 h de tratamiento) y el Pb (la inducción de *TtheMTT5* es superior tras 24 h de exposición al metal). Para todos los metales (excepto el Ni) testados, la inducción de la expresión de *TtheMTT1* y *TtheMTT5* por el metal tras 1 o 24 h de exposición es estadísticamente significativa ($p < 0,05$) respecto a la expresión basal (Figura 21, A y C). Sin embargo, la inducción de *TtheMTT3* sólo resultó estadísticamente significativa ($p < 0,05$) para el Cd, Zn o Cd+Cu (Figura 21, B).

Los niveles de ARNm de estos tres genes aumentan también ante otros estresores ambientales distintos a metales pesados. Los resultados de RT-PCRq reflejan una elevada inducción de la expresión de *TtheMTT5* ante pH ácido (~78 veces, $p < 0,05$) (Figura 21, D) y también, aunque en menor medida, ante pH básico (~6 veces, $p < 0,05$). *TtheMTT5* responde también al estrés oxidativo causado por la exposición a paraquat (~6 veces, $p < 0,05$) y al estrés nutricional (inanición) durante 24 horas (~3 veces, $p < 0,05$) (Figura 21, D). Por el contrario los niveles de *TtheMTT1* y *TtheMTT3* sólo se incrementaron ligeramente ante pH ácido ($p < 0,05$). La inducción producida por el choque térmico de elevada temperatura no es estadísticamente significativa para ninguno de los genes (Figura 21, D).

A.4.2 Análisis comparativo de la expresión de los genes *MTT1* y *MTT2* de *T. rostrata* (*TrosMTT1* y *TrosMTT2*)

De forma similar se analizaron los niveles de expresión de los genes *MTT1* y *MTT2* de *T. rostrata* ante diferentes situaciones de estrés. Los niveles de inducción relativa a la expresión basal (control no tratado) del gen *TrosMTT1* fueron significativamente superiores a los de *TrosMTT2* ante el mismo tipo de estrés (Figura 22, A y B).

En lo referente a los metales pesados, la exposición corta (1 h) al metal incrementó la expresión de los dos genes a mayores niveles que una exposición más prolongada (24 h), excepto para el Zn y el Ni. Además los patrones de expresión de ambos genes en respuesta a metales son bastante diferentes. Mientras que *TrosMTT1* fue inducido preferentemente y significativamente por Cd, Pb y As (aunque el resto de metales ensayados también inducen su expresión a un menor nivel) (Figura 22, A), *TrosMTT2* se expresa mayoritariamente tras la exposición a Cu (aunque también se expresa en respuesta a otros metales) (Figura 22, B); lo que corrobora la denominación de estas MTs como Cd-MT y Cu-MT respectivamente (apartado 3.1 de R). Los niveles de expresión inducidos por todos los metales testados (excepto el Ni para *TrosMTT2*) fueron estadísticamente significativos ($p < 0,01$ o $p < 0,05$) respecto a la expresión basal, como se indica en la Figura 22.

Aunque ambos genes se sobreexpresaron tras un choque térmico (42 °C) de 2 h, sólo la inducción de *TrosMTT1* resultó estadísticamente significativa ($p < 0,01$) (Figuras 22, C y D). Los dos genes *TrosMTT1* y *TrosMTT2* incrementaron su expresión durante la inanición (24h), siendo

la inducción de la expresión de *TrosMTT1* estadísticamente significativa ($p<0,01$) respecto al control, y superior a la de *TrosMTT2*. Sin embargo, tras 4 días de ausencia de nutrientes solamente se sobreexpresó *TrosMTT1* ($p<0,01$) (Figura 22, C y D). El estrés oxidativo producido por el paraquat (PQ) tampoco indujo significativamente la expresión de los dos genes, al igual que tampoco lo hicieron ni el pH ácido ni el básico (Figura 22, C y D).

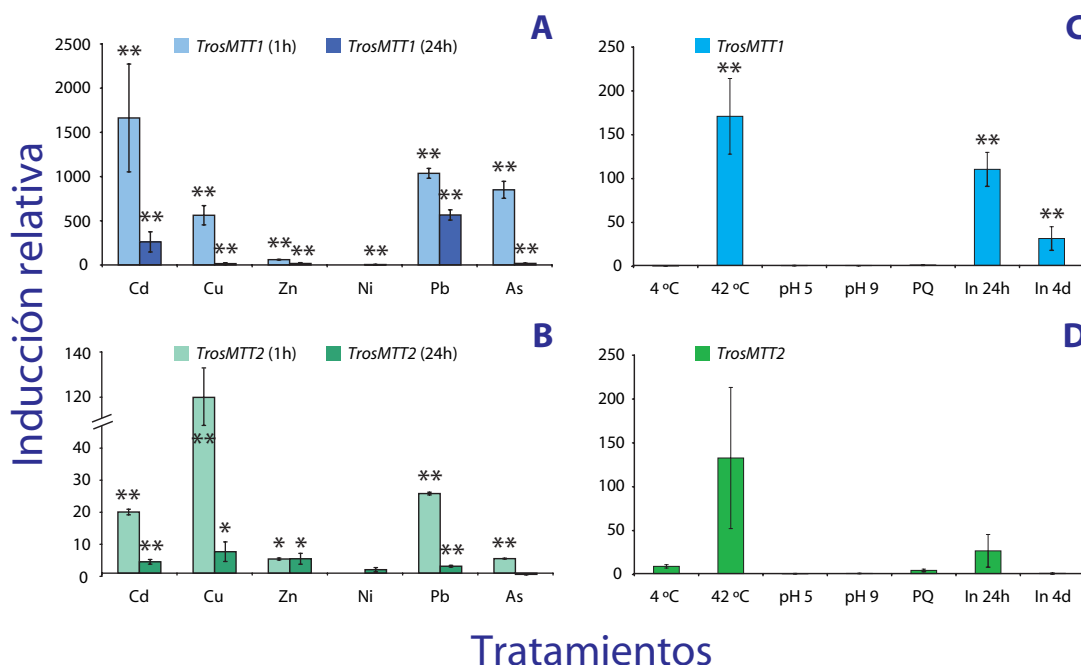


Figura 22. Análisis mediante RT-PCR cuantitativa de la expresión de los genes *MTT1* y *MTT2* de *T. rostrata* bajo diferentes situaciones de estrés. **(A y B):** Inducción relativa de ambos genes respecto al control no tratado tras la exposición de las células a distintos metales pesados durante 24 h. **(C y D):** Inducción de los dos genes tras la exposición de las células a otros agentes estresantes: baja (4°C) y alta (42°C) temperatura durante 2h, pH ácido y básico durante 24 h, Paraquat (PQ) durante 24 h, y ausencia de nutrientes o inanición (In) durante 24 h o 4 días. Las barras representan el nivel de expresión relativa respecto al cultivo control no tratado (valor 1), y normalizados respecto a la expresión del gen constitutivo *ATU1* (α -tubulina). Cada barra corresponde al valor medio \pm la desviación estándar de dos experimentos independientes. Los asteriscos indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas (* $p<0,05$ ó ** $p<0,001$) respecto al control. Las concentraciones de metales empleadas así como las condiciones de cada tratamiento se indican en la Tablas 8 y 9.

A.5 Estudio de la región promotora del gen *MTT5* de *T. thermophila*

A.5.1 Análisis *in silico* de las regiones 5' y 3' UTR del gen *TtheMTT5*

Mediante los programas informáticos de alineamiento múltiple *MEME* y *Gibbs sampler* (apartado 16.2 de MYM), se analizaron las regiones 5' y 3' UTR del gen *MTT5* de *T. thermophila*, en busca de motivos conservados que pudieran estar relacionados con la regulación de la transcripción de dicho gen (Figura 23).

En la región 5'UTR se encontró un motivo conservado repetido hasta trece veces que denominamos MTCM1 (Motivo 1 Conservado en Metalotioneínas), cuya secuencia consenso es 5'ACTCATGATTCACAC3' (Figura 23). Este motivo aparece también en la región promotora de *TtheMTT1* (seis veces), *TtheMTT3* (dos veces) y *TpyrMT-1* (cinco veces). Muchas de las copias

del motivo MTCM1 incluyen la secuencia TGANTCA, que es similar al sitio de unión del factor de transcripción eucariota del tipo AP-1 (TGA[G/C]TCA) (Hurst 1995). La región 5'UTR del gen *TtheMTT5* presenta además una duplicación en tándem de 416 pb. Las dos copias (localizadas desde el nucleótido -212 a -628, y desde -629 a -1.042) presentan un 96 % de homología entre ellas. Cada una de ellas contiene 5 copias del motivo MTCM1 repetido con una periodicidad de 54 pb (Figura 23).

En la presumible región promotora de *TtheMTT5* se encontró también una región conservada de 16 pb, situada a 2-3 pb del codon inicio de la traducción (Figura 23), que aparece también en los promotores de los genes *TtheMTT1* y *TtheMTT3*, compartiendo una homología del 70-87 % respectivamente.

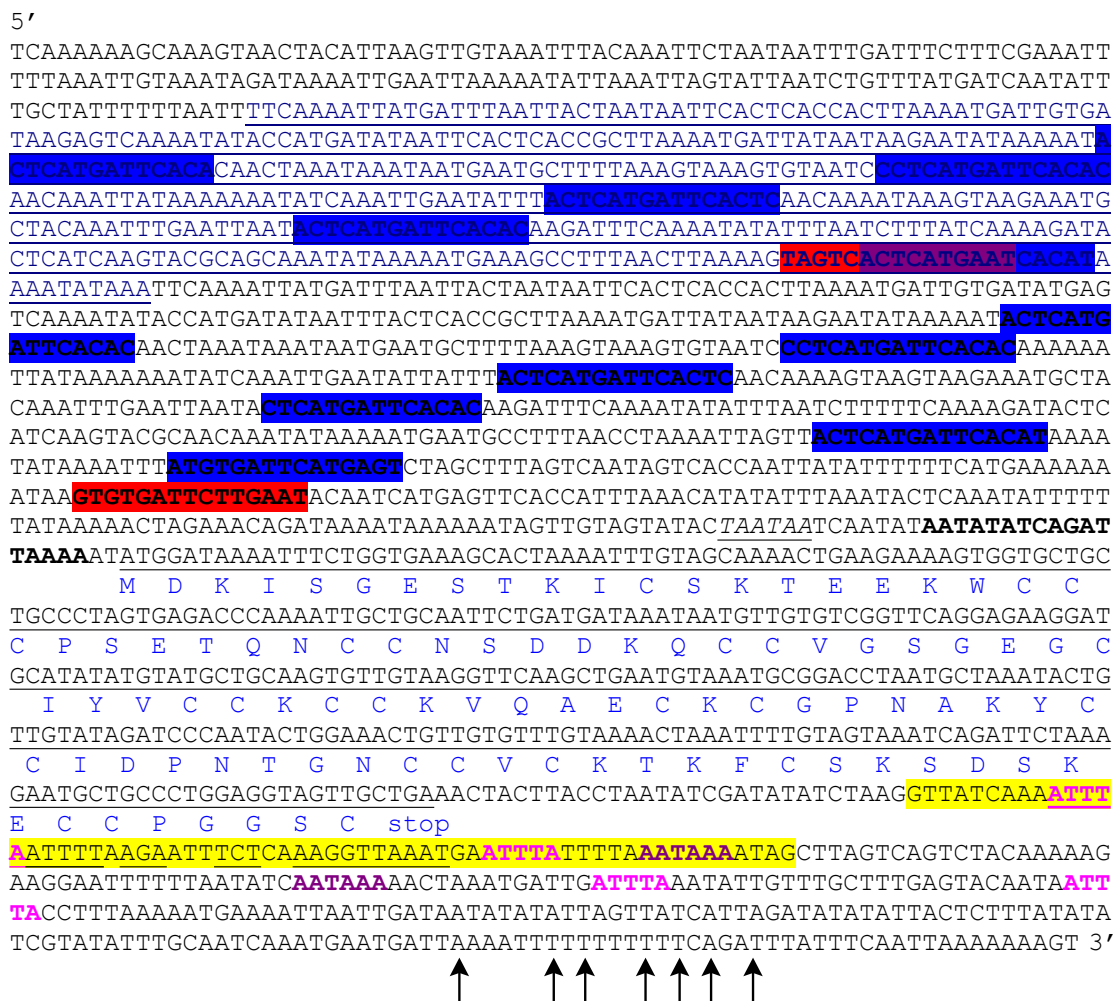


Figura 23. Secuencia nucleotídica del gen *MTT5* de *T. thermophila* y sus regiones 5'y 3'UTR. La secuencia codificante completa (ORF) aparece subrayada, sobre la secuencia aminoacídica inferida que codifica (código IUPAC, azul). La región 5'UTR presenta una duplicación en tándem de 416 pb (la región azul subrayada es la duplicación de la región azul no subrayada). El motivo conservado MTCM1 aparece destacado en azul, y en rojo una copia invertida del mismo. En negrita se indica una región conservada de 16 pb, situada a 2-4 pb del codon de inicio de la traducción, similar a la descrita en los promotores de los genes *TtheMTT1* y *TtheMTT3* de *T. thermophila*. La caja TATA (TAATAA) se muestra subrayada. En la región 3'UTR se indican las posibles señales de poliadenilación (púrpura) y degradación del ARNm (rosa). La región que abarca el intrón se destaca en amarillo y el subrayado indica regiones autoapareantes dentro de dicha secuencia intrónica. Las flechas indican la localización de diferentes sitios de colas poliA identificados tanto a partir de las secuencias ESTs de *TtheMTT5* depositadas en el NCBI, como de nuestras genotecas de expresión de poblaciones celulares tratadas con Cd o As (datos no publicados).

Además se identificó una posible caja TATA (localizada en el nucleótido -32), pero en cambio no se encontraron cajas CCAAT y cajas GC ni los elementos MREs (elementos de respuesta a metales), que son frecuentes en los promotores de genes MT de diversos organismos.

En la región 3'UTR de *TtheMTT5* se identificaron 4 señales de degradación de ARNm (ATTTA) (Figura 23). Además, al alinear la secuencia genómica con diversas secuencias ADNc de este gen (obtenidas de nuestras genotecas de expresión tras el tratamiento de las células con Cd o As (datos no publicados) y de diversas ESTs de genotecas de otros autores disponibles en el NCBI), se detectó la existencia de un intrón de 63 pb, situado 30 pb después del codon de finalización de la transcripción TGA (Figura 23). Dicho intrón contiene sitios canónicos de procesamiento, y representa el primer intrón descrito en transcritos de MTs en *Tetrahymena*. Este intrón contiene en su secuencia dos hipotéticas señales de degradación de ARNm (Figura 23). Como se puede ver en la Figura 24, la región intrónica posee dos regiones de secuencia complementaria que pueden formar horquillas.

Se han encontrado también dos putativas señales de poliadenilación (AATAAA) (Figura 23) descritas en otros genes de *Tetrahymena* (Piccinni *et al.* 1999; Boldrin *et al.* 2003; Dondero *et al.* 2004). Además, a partir de las secuencias de ADNc procedentes tanto de diferentes genotecas de expresión de nuestro grupo (datos no publicados) y de otros autores depositadas en el NCBI, se han identificado diversos sitios de localización de la cola poliA (Figura 23).

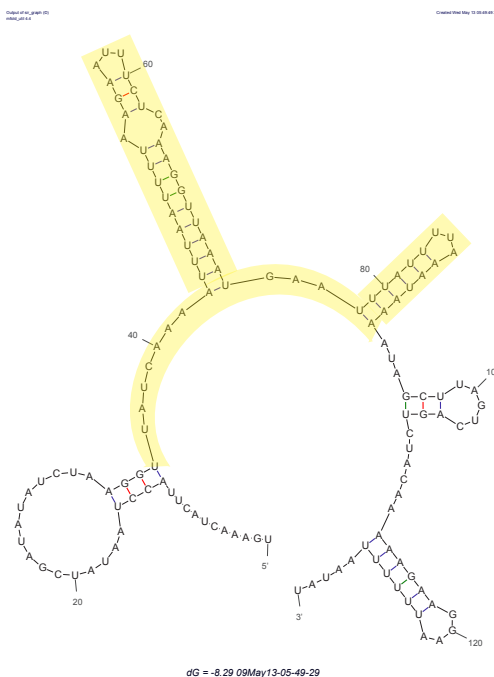


Figura 24. Estructura secundaria de la región 3'UTR que engloba (amarillo) el intrón del gen *TtheMTT5*.

A.5.2 Búsqueda de proteínas implicadas en la regulación del promotor del gen *TtheMTT5*

A.5.2.1 Búsqueda y caracterización estructural de genes de la superfamilia bZIP en el genoma macronuclear de *T. thermophila*

Como se indicó en el apartado A.5.1, en la región 5'UTR del gen *TtheMTT5* se han encontrado numerosos motivos (MTCM1), que son similares al lugar de unión de factores de transcripción del tipo AP-1. Como este tipo de factor de transcripción pertenece a la superfamilia de factores de transcripción bZIP (*Basic leucine zipper*: cremallera de leucina con una región básica), buscamos en el genoma macronuclear de *T. thermophila* ortólogos a genes bZIP.

El genoma de *T. thermophila* presenta cuatro genes anotados como codificantes para cuatro hipotéticas proteínas de la superfamilia de los factores de transcripción bZIP (TTHERM_00349090 o *TthebZIP1*, TTHERM_00442410 o *TthebZIP2*, TTHERM_00245720 o *TthebZIP3* y TTHERM_00442930 o *TthebZIP4*) (Figura 25), y cuyas características se resumen en la Tabla 24. La característica de esta superfamilia es la presencia del dominio bZIP en su secuencia aminoacídica. El dominio bZIP está formado por una región rica en aminoácidos básicos (región básica) seguida de un motivo denominado “cremallera de leucina” (*leucine zipper*, LZ), compuesto por cuatro o más residuos de leucinas que se repiten cada seis aminoácidos (Hurst 1995). A partir del análisis *in silico* de estos cuatro genes, se localizó la presencia del dominio bZIP en la secuencia aminoacídica inferida de cada uno de ellos (Figura 26).

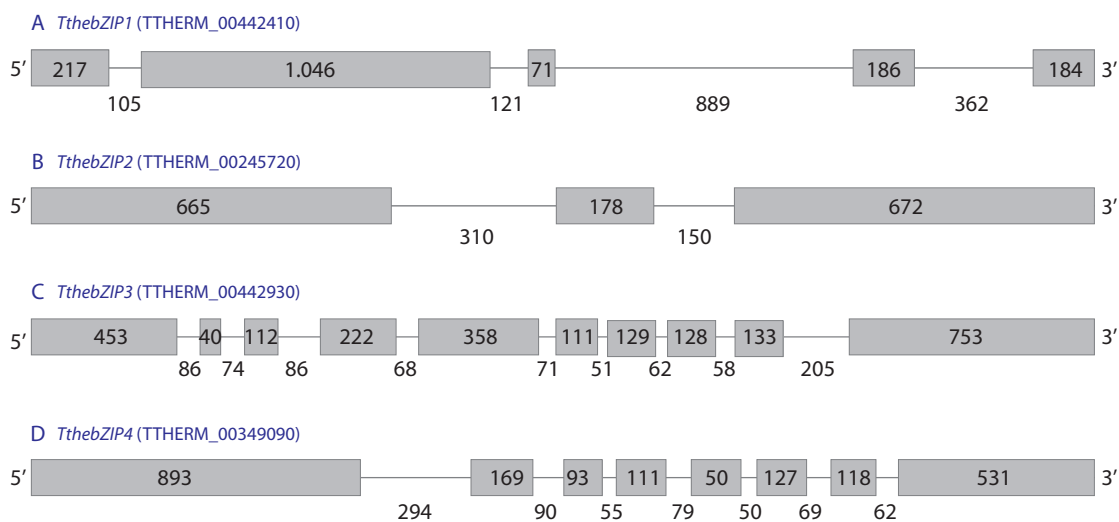


Figura 25. Estructura de los genes putativos codificantes de factores de transcripción de tipo bZIP presentes en el genoma macronuclear de *T. thermophila*. Los números indican la longitud en pares de bases de los exones (cuadros grises) e intrones (líneas) de cada gen. **A:** *TthebZIP1*. **B:** *TthebZIP2*. **C:** *TthebZIP3* y **D:** *TthebZIP4*.

Nombre en este trabajo	Scaffold	MIC	Características del gen				ESTs Nº de Acceso (Genoteca)	Proteína		
			Gen ID	pb	Ex	Int		Nº Acceso	aa	MM (KDa)
<i>TthebZIP1</i>	8254609	1R	4524215	3181	5	4	BM396152 (células en crecimiento)	EAR85491.1	567	64,9
<i>TthebZIP2</i>	8254406	2L	4514651	1975	3	2	--	EAS03556.1	504	58,9
<i>TthebZIP3</i>	8254609	1R	4524271	3242	10	9	--	EAR85543.1	812	93,4
<i>TthebZIP4</i>	8254460	1L	4513918	2868	6	5	BM397881 (células en crecimiento)	EAS02819.1	722	84

Tabla 24. Características estructurales de los genes bZIP presentes en el genoma macronuclear de *T. thermophila*. aa: número de aminoácidos. Ex: número de exones. Gen ID: número de identificación de la secuencia nucleotídica dentro del scaffold. Int: número de intrones. MIC: localización en el cromosoma micronuclear. MM: Masa molecular (KDa). pb: pares de bases. scaffold: región ensamblada. 1L: brazo izquierdo del cromosoma 1 de *T. thermophila*. 1R: brazo derecho del cromosoma 1. 2L: brazo izquierdo del cromosoma 2.

El gen *TthebZIP2* presenta tres exones y dos intrones, y codifica para una proteína de 504 aminoácidos, con una masa molecular estimada de 58,9 KDa. El análisis de su secuencia aminoacídica inferida muestra que la proteína presenta el dominio bZIP hacia el extremo C-terminal de la molécula (del residuo 277 al 331) (Figura 26). La región básica (del residuo 277 al 300) presenta varios de los residuos conservados entre todas las proteínas de la familia bZIP (secuencia consenso N--AA--[CS]R) (Hurst 1995) (Figura 26). El motivo cremallera de leucina (LZ) (del aminoácido 303 al 331) está compuesto por cinco residuos de Leu situados cada seis aminoácidos (Figura 26). Al igual que en el resto de proteínas bZIP, esta región se dispone en forma de α -hélice (Figuras 27, A y F), de modo que cada residuo de Leu ocupa la misma posición rotacional. El dominio LZ permite la dimerización con otra proteína (monómero) bZIP, de forma que las dos α -hélices se asocian formando una estructura denominada *coiled-coil*. Según el análisis *in silico*, la proteína *TthebZIP2* presenta una región (del residuo 300 al 340) que podría formar una estructura de tipo *coiled-coil*, y corresponde al motivo LZ (Figura 27, E).

La secuencia aminoacídica de los otros tres genes (*TthebZIP1*, *TthebZIP3* y *TthebZIP4*) presenta también el patrón bZIP, en el que aparecen varios de los residuos conservados en la región básica (Figura 26). Sin embargo, a diferencia de *TthebZIP2*, el dominio cremallera de leucina (LZ) de estas tres proteínas es más variable. El dominio LZ de *TthebZIP3* y *TthebZIP1* contiene 5 residuos de Leu, pero no se disponen cada seis aminoácidos, como sucede en la familia bZIP (Figura 26). El análisis *in silico* de la estructura secundaria de las dos proteínas confirmó que *TthebZIP1* y *TthebZIP3* presentan un motivo LZ en α -hélice, que podría formar la estructura de tipo *coiled-coil* con otra proteína bZIP (Figura 27, E).

Por otro lado, el dominio LZ de *TthebZIP4* sólo presenta 3 residuos de Leu (Figura 26), dos de ellos contiguos y el siguiente residuo separado 6 aminoácidos, todos ellos en una α -hélice (Figura 27, D).

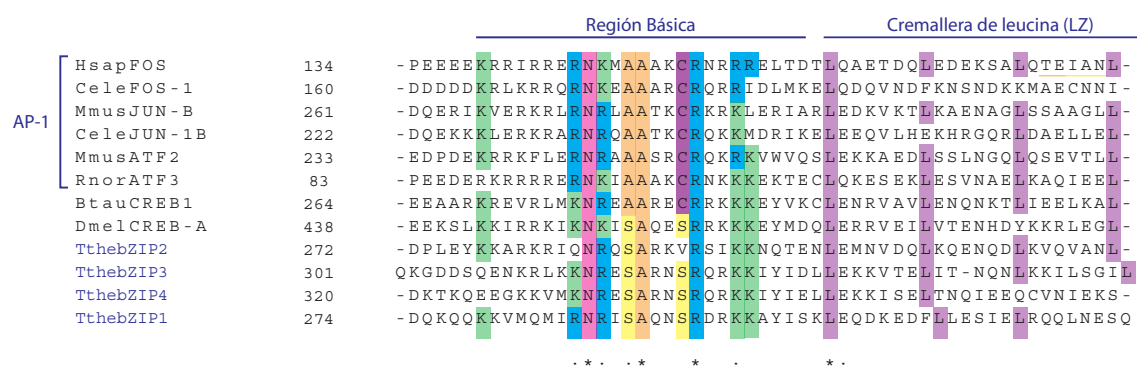
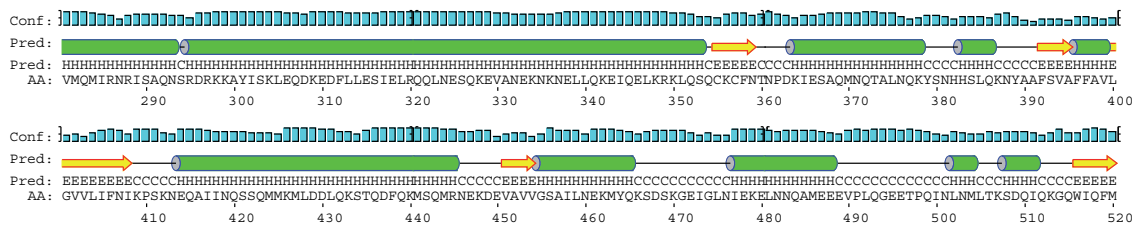


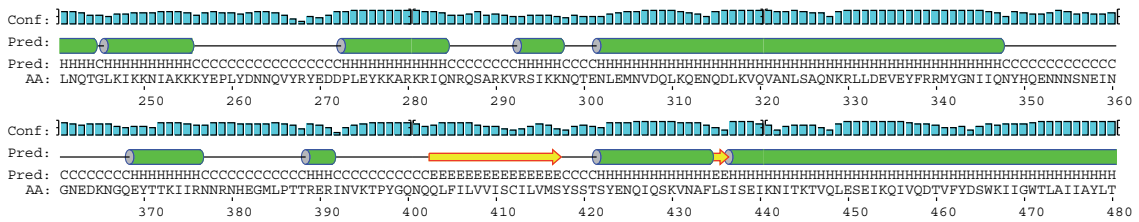
Figura 26. Alineamiento múltiple parcial de secuencias aminoacídicas de las proteínas TthebZIPs con factores de transcripción de la superfamilia bZIP de diferentes organismos. Se muestran la región básica y la cremallera de leucina (LZ). HsapFOS: proteína FOS de *Homo sapiens* (Nº. Acc. CAG47063). CeleFOS-1: proteína FOS-1 de *Caenorhabditis elegans* (Nº. Acc. NP_001033481). MmusJUN-B: proteína JUN-B de *Mus musculus* (Nº. Acc. NP_032442). RnorATF3: proteína ATF3 de *Rattus norvegicus* (Nº. Acc. NP_037044). BtauCREB1: proteína CREB1 de *Bos taurus* (Nº. Acc. P27925). DmelCREB-A: proteína CREB-A de *Drosophila melanogaster* (Nº. Acc. AAA28427). Los números indican la posición del primer residuo mostrado en el alineamiento parcial. AP-1: factores de transcripción considerados como AP-1.

Resultados

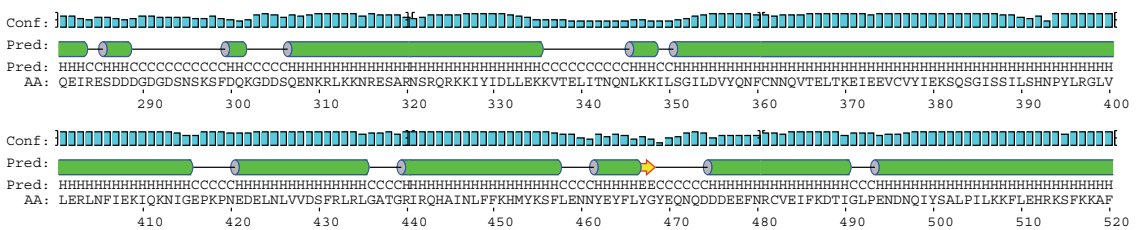
A (TthebZIP1)



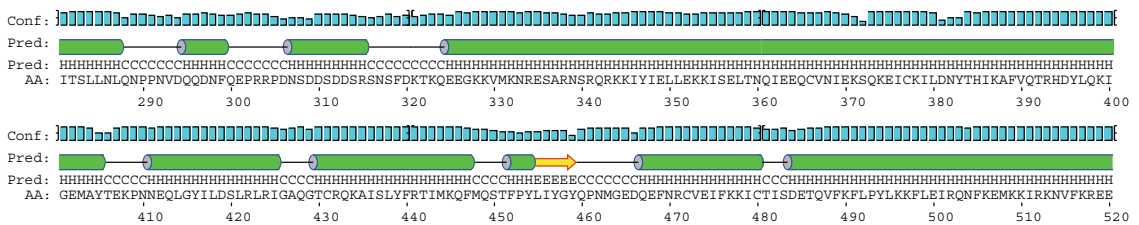
B (TthebZIP2)



C (TthebZIP3)



D (TthebZIP4)



Conf: = fiabilidad de la predicción

Pred: estructura secundaria inferida

AA: secuencia aminoacídica

= α -hélice

= lámina β

= coil

Figura 27. Análisis de la estructura secundaria de las hipotéticas proteínas bZIPs de *T. thermophila*. **(A-D):** Estructura secundaria inferida, según el programa informático *PsiPred*, a partir de la secuencia aminoacídica de cada una de ellas (sólo se muestra la secuencia correspondiente a los residuos 240-280 a 480-520). Los cilindros verdes indican la posición de las α -hélices, y las flechas amarillas las láminas- β . Las barras azules indican el nivel de confianza.

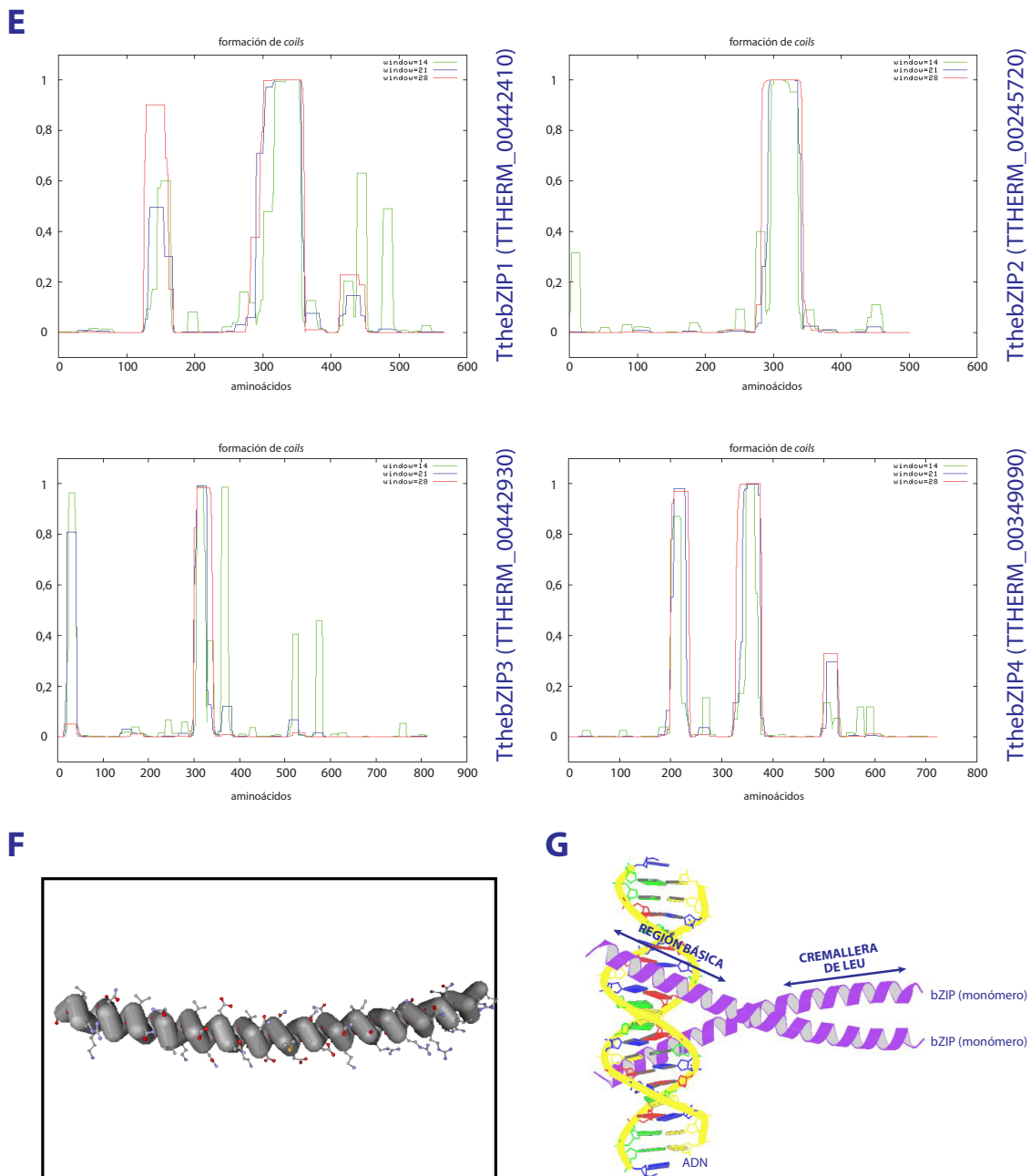


Figura 27. (continuación). Análisis de la estructura secundaria de las hipotéticas proteínas bZIPs de *T. thermophila*. **(E):** Regiones implicadas en la formación de estructuras *coiled-coil*. Cada gráfico muestra las regiones de cada secuencia aminoacídica capaces de interactuar con otra proteína (monómero) bZIP para formar estructuras de tipo *coiled-coil*. **(F):** Región en α -hélice de la proteína TthebZIP2. **(G):** Representación esquemática de la unión de un dímero bZIP al ADN a través de la región básica de cada monómero.

A.5.2.2 Análisis de la expresión de tres de los genes bZIP (*TthebZIP1*, *TthebZIP2* y *TthebZIP3*) de *T. thermophila*

De los cuatro genes bZIP de *T. thermophila*, al menos tres (*TthebZIP1*, *TthebZIP2* y *TthebZIP3*) podrían ser buenos candidatos para codificar el/los posible/s factor/es de transcripción involucrados en la regulación de la expresión de los genes de Cd-MTs de *T. thermophila*. Por esta razón, se analizó si estos genes eran igualmente inducidos por Cd, al igual que los genes Cd-MTs de este ciliado. La Figura 28 muestra el análisis mediante RT-PCR cuantitativa de la expresión de los tres genes bZIP seleccionados respecto a los niveles de expresión basal (cultivo control no tratado), bajo el estrés producido por Cd en condiciones similares a las utilizadas para el análisis de expresión de los genes Cd-MTs.

Los tres genes incrementaron su expresión en respuesta a Cd, aunque *TthebZIP1* presentó un patrón de inducción diferente al de *TthebZIP2* y *TthebZIP3*. *TthebZIP1* parece responder mejor a exposiciones cortas (1h) de Cd, mientras que *TthebZIP3* y *TthebZIP2* alcanzan niveles mayores de expresión a exposiciones prolongadas (24h) (Figura 28).

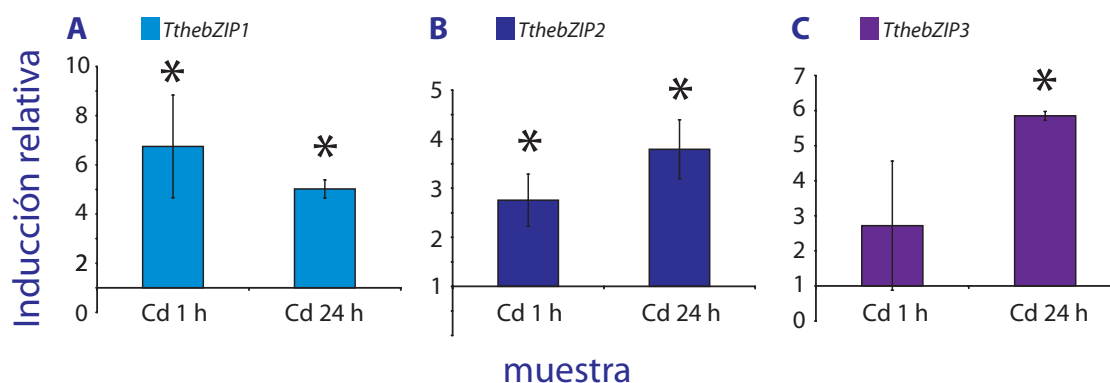


Figura 28. Análisis de los niveles de expresión de los genes *TthebZIP* tras la exposición de las células a Cd 44,5 μ M (1 ó 24h) en medio PP210. Cada barra del histograma representa el nivel de expresión relativa respecto al cultivo control no tratado (valor 1) y normalizados respecto a la expresión del gen constitutivo *ATU1* (α -tubulina). Cada barra corresponde al valor medio \pm la desviación estándar de al menos dos experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la expresión del gen respecto a los niveles basales.

A.5.2.3 Estudio de la interacción del motivo MTCM1 con proteínas presentes en extractos nucleares de *T. thermophila*

Para determinar si al motivo MTCM1 se une alguna proteína de *T. thermophila*, se realizaron varios ensayos de tipo EMSA bajo determinadas condiciones que fueron previamente optimizadas. Mediante esta metodología (apartado 11.2 de MYM) se analizó la potencial unión de las proteínas presentes en un extracto nuclear procedente de células de *T. thermophila* cepa SB1969, expuesta durante 2 h a Cd 0,9 μ M en tampón Tris-HCl 10 mM pH 6,8, al oligonucleótido MTCM1 (Tabla 18) marcado con DIG. Para ello, el oligonucleótido fue incubado durante 30 minutos a temperatura ambiente con concentraciones crecientes del extracto

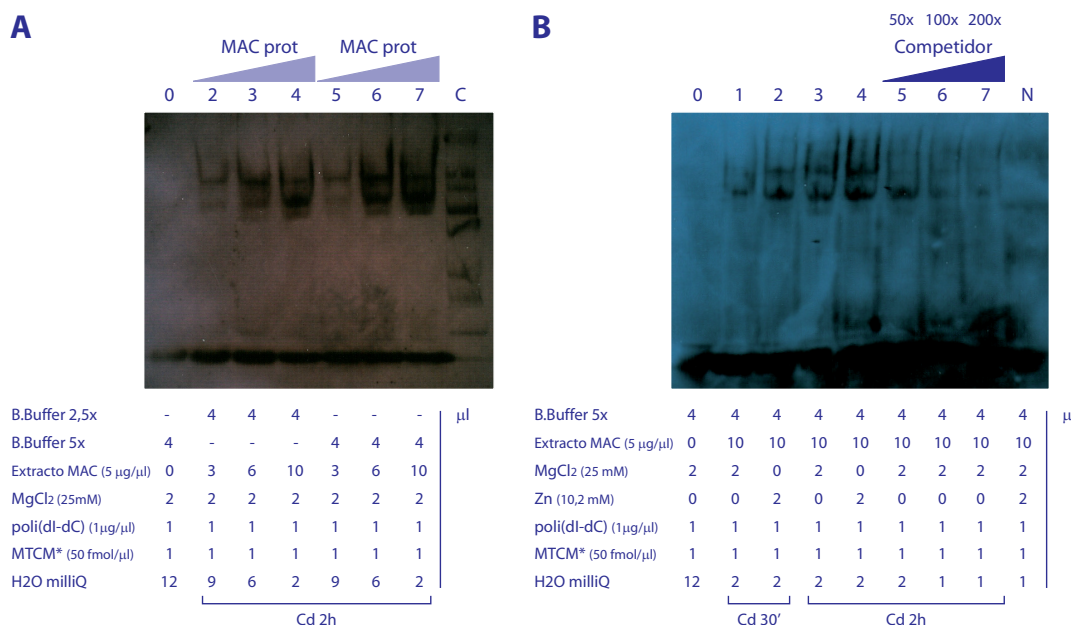


Figura 29. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética del motivo MTCM1. **(A):** El oligo MTCM1 marcado con DIG fue incubado durante 30 minutos a temperatura ambiente con concentraciones crecientes de un extracto nuclear (extracto MAC) de *T. thermophila* y diferentes condiciones de unión. Como competidor inespecífico se añadió el oligonucleótido poli(dI-dC) a la mezcla de reacción. Como control de la detección de DIG se utilizó el marcador M-VI-DIG (Roche) (carril C). Se observa la aparición de dos bandas específicas mayoritarias consecuencia de la formación del complejo ADN-proteína, que provocó un retardo en la movilidad electroforética del oligonucleótido MTCM1 (carriles 2-7) respecto a la reacción control sin extracto nuclear (carril 0). La intensidad de las bandas, y por tanto la cantidad de complejo ADN-proteína formado, aumentó con mayores concentraciones de extracto nuclear y tampón de unión (carriles 5-7). **(B):** Ensayos de competición específica. La especificidad de la unión MTCM1-proteína fue demostrada por la adición del oligonucleótido MTCM1 no marcado (50x, 100x y 200x en exceso) como competidor específico, que redujo significativamente la formación del complejo proteína-ADN marcado (carriles 5-7). Carriles 1 y 2: extracto MAC procedente de un cultivo tratado con Cd durante 30 minutos. Carriles 3-7: el extracto MAC procedente de un cultivo tratado con Cd durante 2 horas. Carril N: el extracto crudo proteico de *E. coli*.

nuclear (preferentemente macronuclear) (Figura 29, extracto MAC) a las condiciones óptimas de unión ADN-proteína que aparecen en la Figura 29. Como competidor inespecífico se añadió el oligonucleótido poli(dI-dC) a la mezcla de reacción. La aparición de dos bandas discretas y mayoritarias cuando el extracto nuclear de *T. thermophila* era incubado con el motivo MTCM1 marcado, indicaba que este ciliado presenta una o varias proteínas que se unen a este motivo. La formación del complejo MTCM1-proteína/s provocó un retardo en la movilidad electroforética del oligonucleótido MTCM1 (Figura 29, A, carriles 2-7) respecto a la reacción control sin extracto nuclear (Figura 29, A y B, carril 0). La intensidad de las bandas, y por tanto la cantidad de complejo ADN-proteína formado, aumentó con mayores concentraciones de extracto nuclear y tampón de unión (carriles 5-7). Además, cuando los extractos nucleares procedían de un cultivo tratado con Cd durante 2 horas (Figura 29, B, carriles 3 y 4), se observaban bandas de mayor intensidad que cuando los extractos procedían de cultivos tratados durante 30 minutos (Figura 29, B, carriles 1 y 2). Cabe suponer por tanto, que las células tratadas con Cd durante 2 horas contenían mayor cantidad de la/s proteína/s capaz/ces de interaccionar con el motivo MTCM1. La especificidad de la unión ADN-proteína fue demostrada por la adición del motivo MTCM1 no marcado (competidor específico) (50x, 100x y 200x en exceso), que redujo signifi-

cativamente la formación del complejo proteína-ADN marcado (Figura 29, B, carriles 5-7). La adición o no de iones Zn^{2+} no incrementaba la formación del complejo ADN-proteína, por lo que en principio no parece que la/s proteína/s que se unen al motivo MTCM1 sea un factor con dedos de Zn (Figura 29, B, carriles 2 y 4).

Se realizaron dos tipos de controles negativos. En primer lugar se incubó el motivo MTCM1 marcado en la mezcla de reacción y en ausencia del extracto nuclear de *T. thermophila* (Figura 30, A y B, carril 0). Y en segundo lugar, el motivo MTCM1 fue incubado en las condiciones de unión con un extracto proteico de *E. coli* (Figura 29, B, carril N). En ambos casos no se observó retardo de la movilidad del oligo marcado MTCM1. Confirmándose así que se trata de una/s proteína/s del ciliado *T. thermophila*.

Una vez comprobada la interacción entre una o varias proteínas presentes en el extracto nuclear y el motivo MTCM1, se trató de determinar la masa molecular aproximada de esta/s proteína/s mediante la técnica de *Southwestern blotting*, y comprobar si se correspondía con la masa molecular inferida a partir de la secuencia aminoacídica de las proteínas candidatas TthebZIP4, TthebZIP1, TthebZIP2 o TthebZIP3 (Tabla 24). Para ello las proteínas presentes en el extracto fueron separadas mediante una SDS-PAGE y transferidas a una membrana PVDF. Tras la renaturalización de las proteínas unidas a la membrana, se ensayó la unión del oligonucleótido MTCM1 marcado con DIG en tampón de unión (Figura 30). La localización del oligonucleótido marcado indicará la posición de la proteína a la que se une en el gel SDS-PAGE, y por tanto, identificará su masa molecular.

Según se observa en la Figura 30 (panel A), se detectan tres bandas quimioluminiscentes, indicando que el oligonucleótido MTCM1 podría interaccionar, al menos, con hasta tres proteínas distintas presentes en el extracto nuclear de *T. thermophila*, cuyas masas moleculares estimadas serían aproximadamente 30-57 kDa, 93 kDa y 93-116 kDa respectivamente (Figura 30, A). Estas masas moleculares son bastante similares o están dentro del rango de alguna de las inferidas a partir de las secuencias aminoacídicas de las proteínas candidatas TthebZIP4 (84 kDa), TthebZIP1 (64,9 kDa), TthebZIP2 (58,9 kDa) o TthebZIP3 (93,5 kDa) (Tabla 24).

Como control negativo se cargó la proteína BSA en el gel SDS-PAGE (Figura 31, A o B, carril C), y como se observa en la figura no se detectó ninguna banda. Se descarta así que las bandas observadas se deban a la unión inespecífica del oligonucleótido MTCM1 a cualquier tipo de proteína.

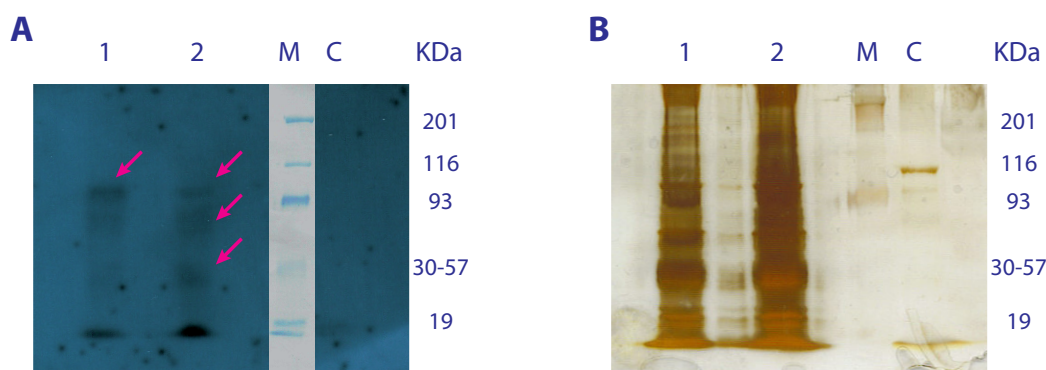


Figura 30. Southwestern blotting del oligonucleótido MTCM1 con un extracto nuclear de *T. thermophila* (cepa SB1969) expuestas durante 2 h a Cd 0,9 μ M. 100 μ g del extracto nuclear fueron separados mediante SDS-PAGE, y las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana PVDF, que fue incubada con el oligonucleótido MTCM1 marcado con DIG en presencia de tampón de unión (apartado 11.3 de MYM). Tras la unión MTCM1-proteína, se detectó la posición del oligonucleótido-proteína mediante una reacción quimioluminiscente (apartado 11.3 de MYM). **(A):** La posición del oligonucleótido determinará la posición de la proteína a la que se une, y por tanto revelará su masa molecular estimada. Como control negativo de la unión se cargó la proteína BSA (100 μ g) en la SDS-PAGE (Panel A, carril C), no detectándose ninguna unión con el oligonucleótido marcado. Carriles 1 y 2: extracto nuclear (duplicado), las flechas indican las diferentes bandas positivas. Carril M: Marcador de tamaño molecular preteñido (Broad Range, Bio-Rad), carril C: BSA. **(B):** Aspecto del gel de poliacrilamida tras la electrotransferencia de proteínas (tinción de plata). El significado de cada carril es el mismo que en el panel A.

A.5.2.4 Separación electroforética de proteínas que interaccionan con el dominio MTCM1

Comprobada la interacción de una o varias proteínas presentes en el extracto nuclear de *T. thermophila* con el motivo MTCM1, se trataron de purificar aplicando el kit comercial *DNA-binding protein purification kit* (Roche) (apartado 11.4 de MYM). Los resultados obtenidos (Figura 31) parecían indicar que mayoritariamente una proteína de aproximadamente unos 50 kDa era retenida por el oligo MTCM1, y era recuperada después en la fracción de elución (Figura 31, carriles 4 y 5). La masa molecular de esta proteína es similar al de una de las proteínas candidatas (TthebZIP2) (58,9 kDa). No obstante, cuando la fracción de elución (que contenía todas las proteínas que quedaban retenidas por el oligonucleótido) fue analizada por SDS-PAGE, aparecían otras proteínas de mayor peso molecular (Figura 31). Desafortunadamente, la cantidad recuperada de estas proteínas (que sólo se detectan tras tinción con plata) resultó insuficiente para su identificación por huella peptídica.

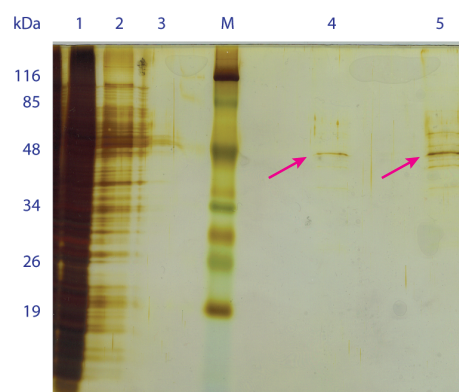
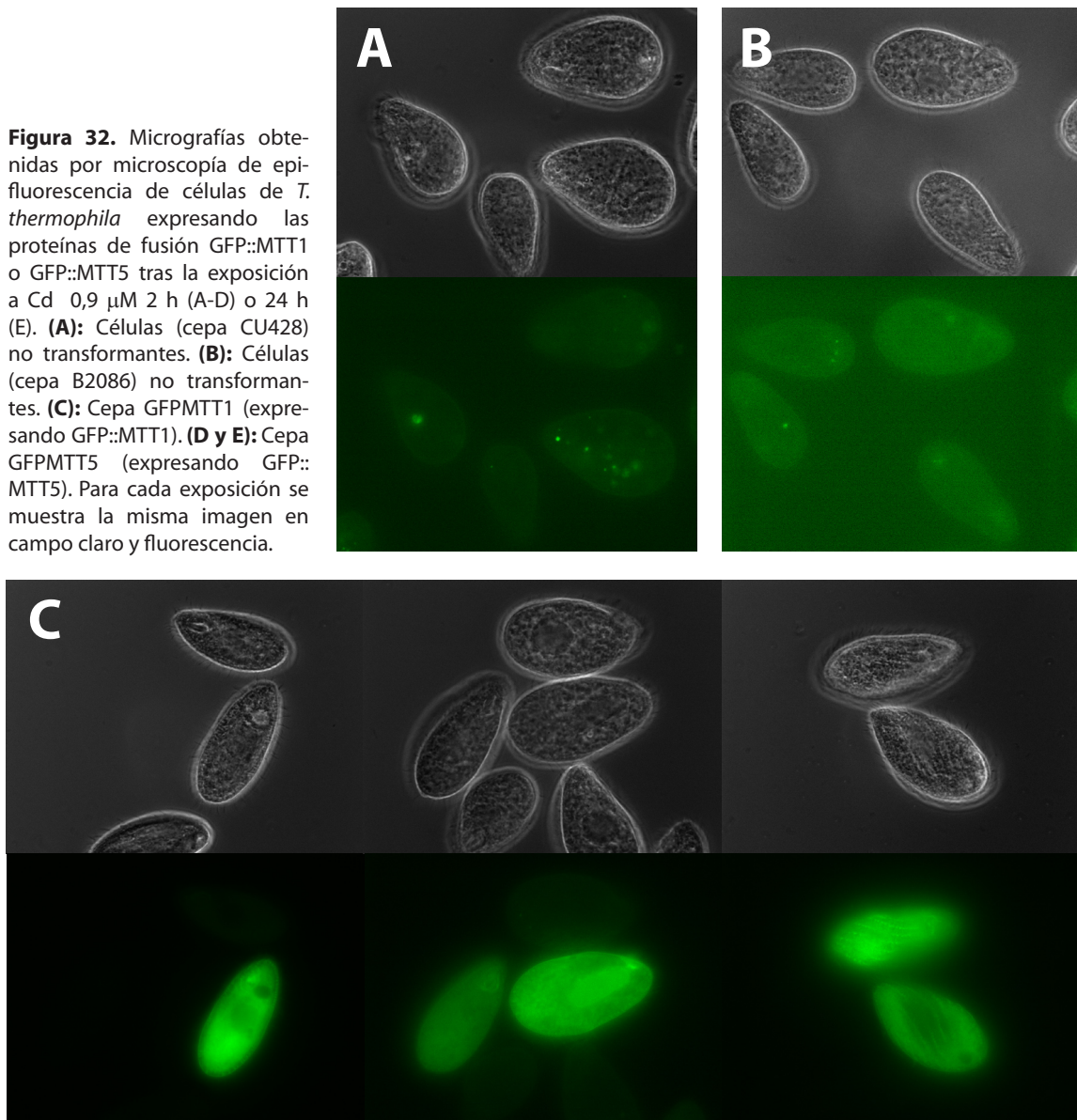


Figura 31. Separación mediante SDS-PAGE de las proteínas presentes en un extracto nuclear de *T. thermophila* que interaccionan con el motivo MTCM1. Tinción de plata. Carril 1: extracto nuclear. Carril 2: proteínas no unidas al motivo MTCM1. Carril 3: fracción de lavado. Carriles 4 y 5: fracción que contiene las proteínas que interaccionan con el motivo MTCM1. Carril M: Marcador de masa molecular (*Prestained Protein Molecular Weight Marker*, Fermentas). El extracto proteico fue aislado a partir de un cultivo tratado con Cd 0,9 μ M en tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8 durante 2 horas.

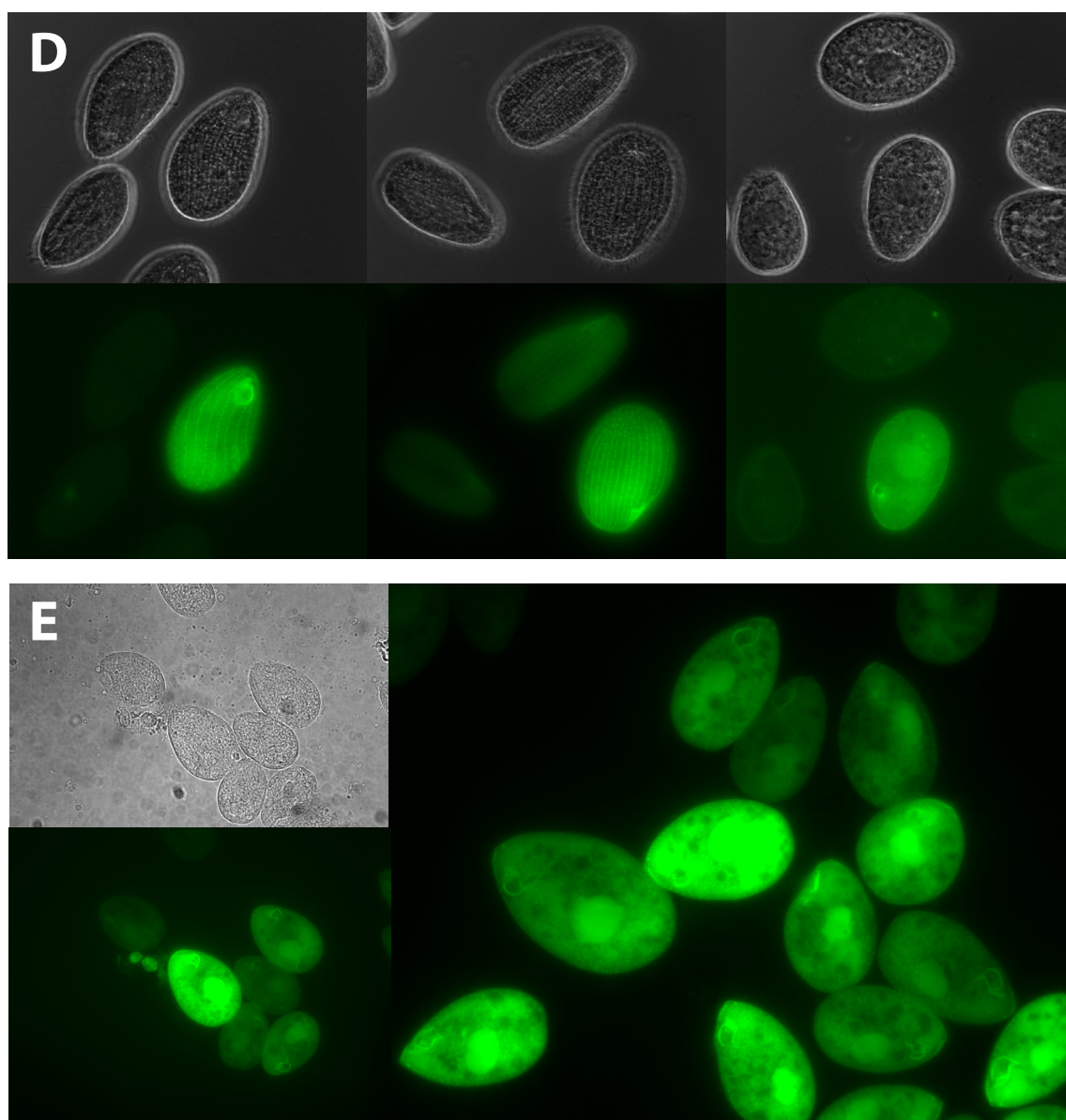
A. 6 Localización subcelular de las proteínas MTT1 y MTT5 de *T. thermophila*: Estudio *in vivo* y ultraestructural de cepas transformadas (que sobreexpresan MTs) y cepas control (fenotipo salvaje) bajo el estrés causado por Cd

Para determinar la localización celular *in vivo* de las proteínas TtheMTT1 y TtheMTT5 se llevó a cabo su etiquetado con la proteína GFP (*GFP-tagging*). Para ello se escogió fusionar la proteína GFP al extremo N-terminal de TtheMTT1 o TtheMTT5, ya que el último aminoácido de la secuencia de TtheMTT5 es un residuo de Cys. Las construcciones génicas que originaban las proteínas de fusión GFP::MTT1 o GFP::MTT5 fueron expresadas tras su incorporación (por electroporación) en *T. thermophila*, originando las cepas denominadas GFPMTT1 y GFPMTT5 respectivamente, las cuales fueron expuestas a Cd 9×10^{-7} M en medio PP210 o Tris-HCl 0,01 M pH 6,8 (2 ó 24 h). La localización celular de estas proteínas se analizó mediante microscopía de epifluorescencia.

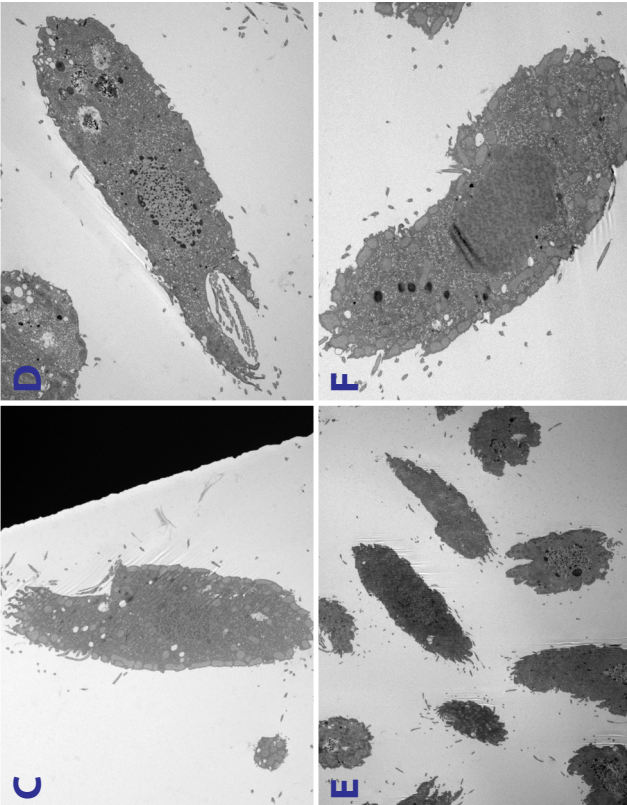
Figura 32. Micrografías obtenidas por microscopía de epifluorescencia de células de *T. thermophila* expresando las proteínas de fusión GFP::MTT1 o GFP::MTT5 tras la exposición a Cd $0,9 \mu\text{M}$ 2 h (A-D) o 24 h (E). **(A):** Células (cepa CU428) no transformantes. **(B):** Células (cepa B2086) no transformantes. **(C):** Cepa GFPMTT1 (expresando GFP::MTT1). **(D y E):** Cepa GFPMTT5 (expresando GFP::MTT5). Para cada exposición se muestra la misma imagen en campo claro y fluorescencia.



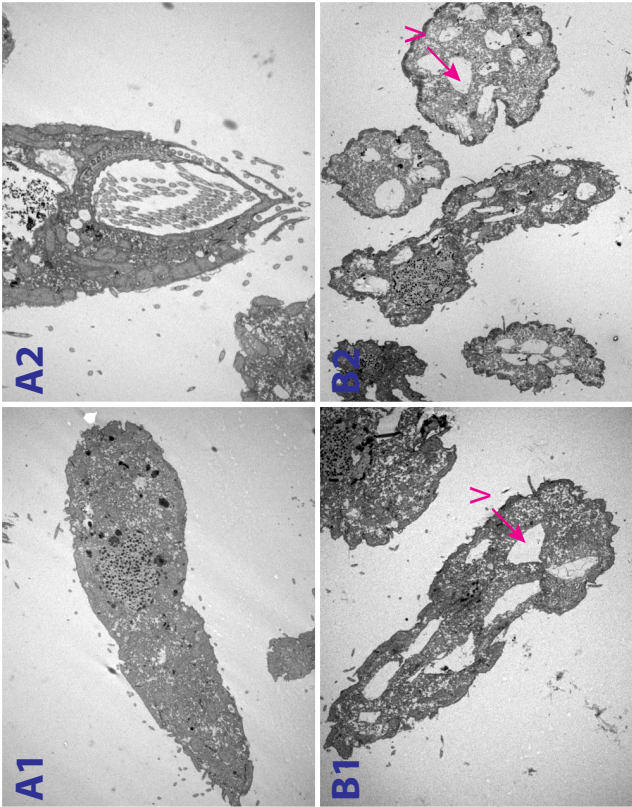
Los resultados obtenidos (Figura 32, C y D) indicaban que las proteínas de fusión GFP::MTT1 o GFP::MTT5 se localizaban por todo el citoplasma de *T. thermophila*, no existiendo una localización determinada en vacuolas u otro orgánulo, o en una región diferencial del citoplasma celular. Tras 24 horas de exposición a Cd, el resultado obtenido fue el mismo (Figura 31, E), por lo que parece que en este ciliado y a este nivel de sobreexpresión de las MTs, los complejos MT-Cd no se acumulan en vacuolas, sino que aparentemente se reparten por todo el citoplasma. Las proteínas TtheMTT1 y TtheMTT5 fusionadas a GFP continúan siendo funcionales (con capacidad de unir metal), como lo demuestra el aumento de resistencia a Cd de la cepa GFPMTT5 (apartado C.1.2.3 de R), que sobreexpresa la proteína de fusión GFP::MTT5.



Para alcanzar una mayor resolución en cuanto a la detección de depósitos metálicos intracelulares (potenciales complejos metal-MT), se aplicó microscopía electrónica de transmisión estándar (TEM), que fue igualmente útil para detectar los principales cambios intracelulares experimentados por *T. thermophila*, bajo el estrés originado tras la exposición a Cd (0,9 μ M durante 2 ó 24 h ó 8 μ M durante 2h), usando tanto la cepa salvaje SB1969 como la transformada GFPMTT5. Como se puede comprobar en las micrografías de la Figura 33, las células de la cepa salvaje SB1969 tratadas con Cd (0,9 μ M, 2h) muestran una intensa vacuolización (Figura 33, B1 y B2) (de 7 a 10 vacuolas/célula en un corte longitudinal) en comparación con el control no tratado (Figura 33, A1 y A2). Sin embargo, para las células de *T. thermophila* transformadas (cepa GFPMTT5), tanto el control (Figura 33, C) como los tratados con Cd (a 2 ó 24h) (Figura 33, D-F) no mostraron una intensa vacuolización, siendo más parecidas a la cepa salvaje SB1969 no tratada con Cd (Figura 33, A1 y A2). Observando el citoplasma con más detalle (Figura 34) en la cepa no transformada SB1969, se aprecia que en las células tratadas con Cd (2h) existe, ligada a la vacuolización, abundancia de estructuras membranosas (Figura 34, B) respecto a lo que se aprecia en el control (Figura 34, A). No se observaron alteraciones importantes en la estructura e integridad de orgánulos celulares como mitocondrias, macro- o micronúcleo y cilios, en las células (tanto la cepa SB1969 como la GFPMTT5) expuestas al metal (datos no mostrados). Tampoco se observaron grandes acumulaciones de metal (material altamente osmíófilo) en el interior de compartimentos celulares o en el citoplasma de ambos tipos de cepas.



GFPMTT5



SB 1969

Figura 33. Microfotografías obtenidas por TEM de cortes ultrafinos longitudinales y/o transversales de células de *T. thermophila* cepas SB1969 (A y B) y GFPMTT5 (C-F) expuestas o no a Cd en tampón Tris-HCl 0.01 M pH 6.8. **(A1 y A2):** cepa SB1969 control (A1, x4K; A2, x8K). **(B1 y B2):** cepa SB1969 expuesta a Cd 0.9 μM 2h, (B1, x4K; B2, x2.5K). **(C):** cepa GFPMTT5 control, x4K. **(D):** cepa GFPMTT5 expuesta a Cd 0.9 μM 2h, x4K. **(E):** cepa GFPMTT5 expuesta a Cd 8 μM 2h, x2K. **(F):** cepa GFPMTT5 expuesta a Cd 0.9 μM 24h, x6K. V: vacuola.

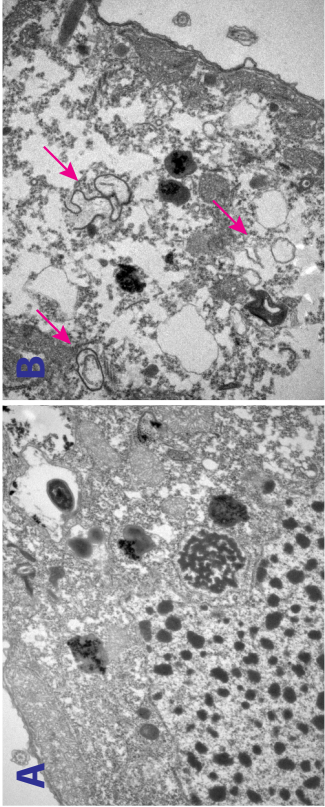


Figura 34. Detalle del citoplasma de células de *T. thermophila* cepa SB1969 control **(A)** y tratada con Cd 0.9 μM 2h **(B)**. Las flechas indican la localización de las numerosas estructuras membranosas presentes en el citoplasma de las células expuestas al metal, x25K.

B. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN *TtΨPCS* CODIFICANTE PARA UNA PSEUDOFITOQUELATÍN SINTASA EN *T. thermophila*

B.1 Aislamiento y caracterización estructural del gen *TtΨPCS* de *T. thermophila*

Una vez analizados los genes codificantes de MTs en el ciliado *T. thermophila* nos preguntamos sobre la posibilidad de la existencia de fitoquelatinas (FQs) (otro tipo de molécula queladora de metales, presente en diversos organismos) o de la enzima que las sintetiza (fitoquelatín sintasa, FQS) en este microorganismo eucariota. Para la búsqueda de genes homólogos a fitoquelatín sintasas (FQSs) en el genoma macronuclear de *T. thermophila* se diseñaron varias parejas de cebadores a partir de las regiones conservadas de las secuencias de FQSs de *C. elegans* (*CePCS*) (Nº Acc. AAK62992) y *S. pombe* (*SpPCS*) (Nº Acc. SPAC3H1). La pareja de cebadores FQSN1/FQSN3 (Tabla 10) amplificó por PCR estándar varios fragmentos a partir de ADN genómico de *T. thermophila*. Uno de ellos (517 pb), tras análisis por BLAST, presentaba homología con secuencias fitoquelatín sintasas de otros organismos. Tras la secuenciación completa del genoma macronuclear de *T. thermophila*, se localizó el fragmento amplificado en la región ensamblada (scaffold) 8254697 (Nº Acc. CH445695) del mismo, y se diseñaron los cebadores FQS1/FQS2 específicos (Tabla 10) para amplificar por PCR el gen completo.

Este gen se localiza en el brazo derecho del cromosoma micronuclear 3. El gen completo tiene una longitud de 2.615 pb, y presenta 4 exones (114, 156, 294 y 762 pb) y 3 intrones (129, 79 y 1069 pb), con contenido en A + T de 83, 92 y 84 % respectivamente. Dichos intrones no presentan sitios de procesamiento canónicos, pero su localización es similar a la de los intrones encontrados en el dominio N-terminal del gen *AtPCS1* (Nº Acc. AF085230). La región codificante comprende 1.341 pb, y codifica para una proteína de 446 aminoácidos con una masa molecular estimada de 52,4 kDa, que está dentro del rango de 45-55 kDa que presentan todas las FQS eucariotas conocidas. El marco de lectura cambia hasta 3 veces; comienza en el nucleótido +3 para los dos primeros exones (114 y 168 pb), en el nucleótido +1 para el tercer exón (294 pb), y en el +2 para el último exón (762 pb) (Figura 35, A). La secuencia codificante (ORF) completa se obtuvo como ADNc, mediante RT-PCR a partir de ARN total procedente de un cultivo del ciliado tratado con CdCl₂ durante 24 h (Figura 35 y 36). De acuerdo a la nomenclatura establecida para genes FQSs, denominamos este nuevo gen *TtPCS* y su secuencia nucleotídica fue introducida como ADNc en el GeneBank, con el número de acceso DQ082725. Posteriormente fue incluido en la base de datos del genoma de *T. thermophila* con esta misma denominación. Tras dilucidar que este gen codifica para una pseudofitoquelatín sintasa, se decidió denominarlo *TtΨPCS*. Igualmente, se llevó a cabo una búsqueda *in silico* de genes homólogos a FQSs en el genoma (completamente secuenciado) del ciliado *Paramecium tetraurelia*, obteniéndose un único gen que denominamos *PtPCS* (Nº Acc. XP00147068). Tiene una longitud de 1.206 pb, con cuatro exones (de 510, 164, 224 y 235 pb) y da lugar a una proteína de 378 aminoácidos, con una masa molecular estimada de 44,4 kDa.

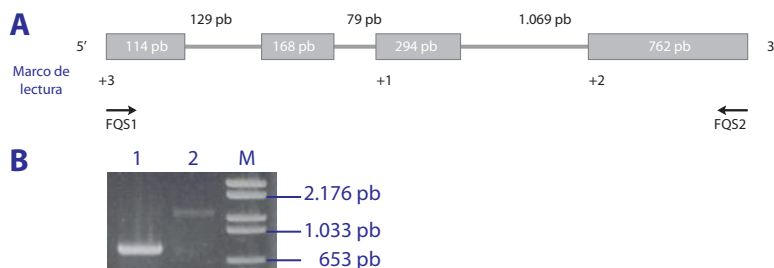


Figura 35. Estructura del gen *TrΨPCS*. **(A):** Estructura exón-intrón del gen *TrΨPCS*. Los números indican la longitud en pares de bases (pb) de cada exón (cajas sombreadas) e intrón (línea). El gen macronuclear tiene una longitud de 2.615 pb. Presenta 4 exones (114, 168, 294 y 762 pb) y 3 intrones (129, 79 y 1069 pb, con un % de A+T : 83,92 y 84 %, respectivamente). La región codificante completa tiene una longitud de 1.341 pb, y origina una proteína de 446 aa con una masa molecular estimada de 52,4 kDa. **(B):** Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación por RT-PCR de la secuencia codificante de *TrΨPCS* a partir de ARN total procedente de un cultivo de *T. thermophila* expuesto durante 24h a CdCl_2 ($\text{Cd } 4,45 \times 10^{-5} \text{ M}$). Calle 1: producto de RT-PCR correspondiente al último exón. Calle 2: producto de RT-PCR correspondiente al ORF completo sin intrones. M: Marcador M VI (Roche). FQS1 y FQS2: cebadores para la amplificación del gen completo.

```

5'
ATGTCCTCGTTCACCTATTCAAGAAAATGTTCTATTAATTTTCAGCAGTAGAACAATAAGTTTAAACAGTTTATAAGCGT
M S R S L F K K M F Y Q F S A V E Q Q V Q T V Y K R
CCTCTACCAAAAATATGATTAATTTTCGAGTGAATAAGGTAAAAACTATTTAAAGAAGCACTGAAGAGGGTAAT
P L P K I L I N F S S E Q G K K L F K E A L E E G N
ATGGAATGTTATTTTCCTTTAAGTGAATAATTTAGACTTAGCTTGAACCTTCAACATGTGGTTCTACTACATTAGCG
M E C Y F P L S E Q F M T Q L E P S T C G S T T L A
ATGGTACTTAATACGTTAAATTTAGACCCAAAAAGCGCTGGAAAGGAATATGGAGATGGTATAGCGAAGAACTTTA
M V L N T L N L D P K K R W K G I W R W Y S E E T L
GAGGGGATGAAACCAGAATATATTAATAGGGAATTGATTAGAAAATTTTCTCATAACAAAGCATAATAACGCA
E G M K P E Y I K Q G I D L E N F S H I T K H N N A
TCTATTTAAACATTTTATTCACATGAACACTAAAGTTAATCTTCAAATATGACTGTGAATATCACTGCTCTAAA
S I Q T F Y Y P H E H Q S Q S S K Y D C E Y H C S K
GATAAAATAAAATCAGCTTCNTATTCAACTTTTGTATTATTCGCTCACTGCTTGTGTGCTCGCACTGGACTATATAG
D K I K S A S Y S T F V I C L T A C C R R T G L Y M
GTCTTAACTAATCAAGAAAAGCTCTTAGTTAAACAGGAGAGGGACATTTTTCAGCTGTCGGTGGATTAAATATGGCT
V L N Q S R K A L S Q T G E G H F Q P V G G L N M A
CATTAAAAAGCTTTTGATTTGATGTAGCAAGATTTAAATATCCTCCTTATTGGTGCAACTTAGATCTTTTATATGAG
H Q K A L L M F D V A R F K Y P P Y W C N L D L L Y E
TCACTTAAAAGTTTAGACAATGTAACATAAAAGACCTAGAGGATTTGCTTTAATATCAAGGGATTTAGAAAATTTTAGC
S L K S L D N V T K R P R G F A L I S R D L E N F S
AAGATTTCGAGCATTAGTCCTGACTAAGTGTCTAAAAAGAACTTTAAATAAAGCTGCAAAGTGAGAATTTTATGAGT
K I C S I S P D Q V S K K L L Q I K L Q S E N F M S
AATTACAAAGATATAGATTATAAATGATTAAATAGATTCTACTAAAGTTTTTTAAAGAGATGGGATTTGATTTT
N Y K D I D Y K Y D L I D F Y Q S F L K E M G F D F
TCTGTTTTATTGGTTTATAATATGTATGAAGTTATGAATTACTTTGAAAAGTAAGGAGAATAAGCAGATTATTGTTT
S V L L V Y N M Y E V M N Y F E K Q G E Q A D Y L F
TAGGCTTTTCTAAAAATTAAATTTACAAAATTAGTGAATAAATAATTTGCAAGTTATTAGAGGAAAAGAGTGAAAGTA
Q A F S K N Q I Y K I S E K I I C K L L E E K S E A V
GGAATTTTGATAACAGAATTTTGTGGAATTTATGCTCCATTGATCGCTAGTTTAGTTCTTTTATCGATTCTCTGAAAGT
G I L I T E F C G N Y A P L I A S L V L L S I P E S
TAATATATGAAAATTAATAAAATTTATACAAAACGATATCAAAAAATTAATTGATGAATATAAAGATTTAGACCAT
Q Y M K I N K N L Y K N D I K K L I D E Y K D L D H
AAAGAAAATTTAGACAACGAATTAGAAATTGAAATTAGGAAATATATGAAATAAATTGTTGTGTCCTTTAAAAATAAT
K E N L D N E L E I E I R K Y M K Q I V V S F K N N
CTTTTTTAAAGTTGA 3'
L F Q S stop

```

Figura 36. Región codificante completa o ADNc del gen *TrΨPCS*, obtenida por RT-PCR a partir de ARN total extraído de un cultivo de *T. thermophila* expuesto a CdCl_2 ($\text{Cd } 44,5 \mu\text{M}$) durante 24 horas, empleando las parejas de cebadores FQS1/FQS2 (regiones sombreadas). La secuencia aminoacídica (código IUPAC de una letra) aparece en azul, bajo la secuencia codificante subrayada.

B.2 Análisis de la secuencia aminoacídica de TtΨPCS. Análisis comparativo y filogenético de TtΨPCS con otras secuencias FQS

La secuencia aminoacídica inferida del gen *TtΨPCS* se comparó con FQSs de otros organismos, empleando el programa de alineamiento múltiple *Tcoffee* (Notredame *et al.* 2000). *TtΨPCS* mostró el mayor porcentaje de identidad de secuencia (62 %) con la hipotética FQS de *P. tetraurelia* (PtPCS, N° Acc. XP001447068). Respecto a las FQSs descritas en otros eucariotas, *TtΨPCS* presentó un 48 % de identidad con la de *S. pombe* (SpPCS, N° Acc CAA92263), 47 % de identidad con la FQS de *C. elegans* (CePCS, N° Acc AAK62991), 23 % con la de *Dictyostelium discoideum* (DdPCS, N° Acc DDB0219651), y aproximadamente un 39-47 % con FQS de plantas. La identidad entre *TtΨPCS* y las proteínas homólogas a FQSs descritas en cianobacterias varía del 45-47 % dependiendo de la especie (Figura 37).

Al igual que ocurre en todas las secuencias aminoacídicas de FQSs descritas (Clemens 2006), el nivel de conservación de residuos en el dominio N-terminal de *TtΨPCS* es mucho mayor que en el C-terminal (Figuras 38-39).

El alineamiento de *TtΨPCS* con FQSs de otros organismos refleja un mayor nivel de conservación (31-67 % de identidad) para la primera mitad de la proteína (N-terminal) (Figura 38) con respecto a la segunda mitad de la molécula (C-terminal), con un rango de variación mayor y menor porcentaje de residuos conservados (15-43 % de identidad)

	AtPCS1	AtPCS2	TaPCS	BjPCS	StPCS	GmPCS	CePCS	SpPCS	DdPCS	TtΨPCS	PtPCS	NsPCS	AvPCS	BxPCS	PmPCS
AtPCS1	100	85,4	71,1	94,7	75,8	75,7	48,7	48	31,1	42,7	42,4	43,2	43,2	39,4	39,1
AtPCS2		100	68,6	84,6	73	73,9	51,6	49,9	30,6	46,9	46,6	47,3	47,3	43,3	43,5
TaPCS			100	70,6	73,8	72,7	47	45,5	29,6	39,8	39,7	41,1	41,1	38,1	37,9
BjPCS				100	76,5	75,4	48,6	48,2	31,2	42,7	42,8	43,3	43,3	39,4	39,4
StPCS					100	78,5	48	45,2	31,2	39,9	40,1	41,5	41,5	37,8	37,5
GmPCS						100	47	46,5	30,3	41,1	40,1	41,5	41,5	38,5	37,8
CePCS							100	49,3	33,6	46,5	50,9	57	57,6	55	55,7
SpPCS								100	30,8	48,1	46,2	52,6	52,8	51,3	51,9
DdPCS									100	23,3	21,2	26,5	26,7	24,6	25,2
TtΨPCS										100	61,5	46,8	47,2	44,7	45,1
PtPCS											100	54,4	55,1	52,3	52,6
NsPCS												100	97,8	80,1	80,2
AvPCS													100	80	80,1
BxPCS														100	77,6
PmPCS															100

Figura 37. Matriz de identidad obtenida de la comparación de la secuencia aminoacídica completa de la *TtΨPCS* con FQSs de diferentes organismos eucariotas y procariotas. AtPCS1, AtPCS2: *Arabidopsis thaliana*. AvPCS: *Anabaena variabilis* ATCC 29413. BjPCS: *Brassica juncea*. BxPCS: *Burkholderia xenovorans* LB400. CePCS: *Caenorhabditis elegans*. DdPCS: *Dictyostelium discoideum*. GmPCS: *Glycine max*. NsPCS: *Nostoc* sp. PCC7120. PtPCS: *Paramecium tetraurelia*. PmPCS: *Prochlorococcus marinus* str. MIT 9313. SpPCS: *Schizosaccharomyces pombe*. StPCS: *Solanum tuberosum*. TtΨPCS: *Tetrahymena thermophila*. TtPCS: *Triticum aestivum*.

(Figura 39). La región N-terminal de *TtΨPCS* presenta también los tres residuos altamente conservados en todas las FQSs que constituyen la triada catalítica de la enzima (Rea *et al.* 2004). De acuerdo con el alineamiento de secuencias FQS (Figuras 40 y 41), los residuos Cys-72, His-198 y Asp-216 de *TtΨPCS* formarían la triada catalítica de la enzima. Sin embargo, la proteína *TtΨPCS* solamente presenta 1 de las 5 Cys (Figura 41) conservadas de la región N terminal de las FQSs eucariotas (Rea *et al.* 2004).

El rasgo más característico del dominio variable C-terminal de las FQSs es la presencia

de múltiples residuos de Cys, aislados o dispuestos en parejas Cys-Cys; que recuerda a la organización de algunos de los residuos Cys en las metalotioneínas (Coyle *et al.* 2002). Mientras que el dominio C-terminal de las FQSS eucariotas descritas contiene entre 7-14 residuos de Cys, las hipotéticas FQSS de ciliados presentan un menor número de residuos, tan sólo 3 y 2 Cys para TtΨPCS y PtPCS respectivamente (Tabla 25 y Figura 41).

Tabla 25. Número y porcentaje de residuos de Cys de los dominios N- y C-terminal de FQSS de diferentes organismos. aa: número total de aminoácidos de la proteína completa. % Cys: porcentaje de residuos de Cys de la proteína completa.

	Número de Cys		aa	% Cys
	N-ter	C-ter		
AtPCS1	7	10	485	3,51
AtPCS2	6	7	452	2,88
BjPCS	7	11	485	3,71
GmPCS	8	12	498	4,02
StPCS	7	11	503	3,58
TaPCS	7	14	500	4,20
CePCS	7	10	371	4,58
DdPCS	10	9	626	3,04
SpPCS	11	7	414	4,35
PtPCS	6	2	378	2,12
TtPCS	8	3	446	2,47
AvPCS	2	0	239	0,84
NsPCS	2	0	242	0,83
BxPCS	1	0	247	0,40
PmPCS	1	0	249	0,40

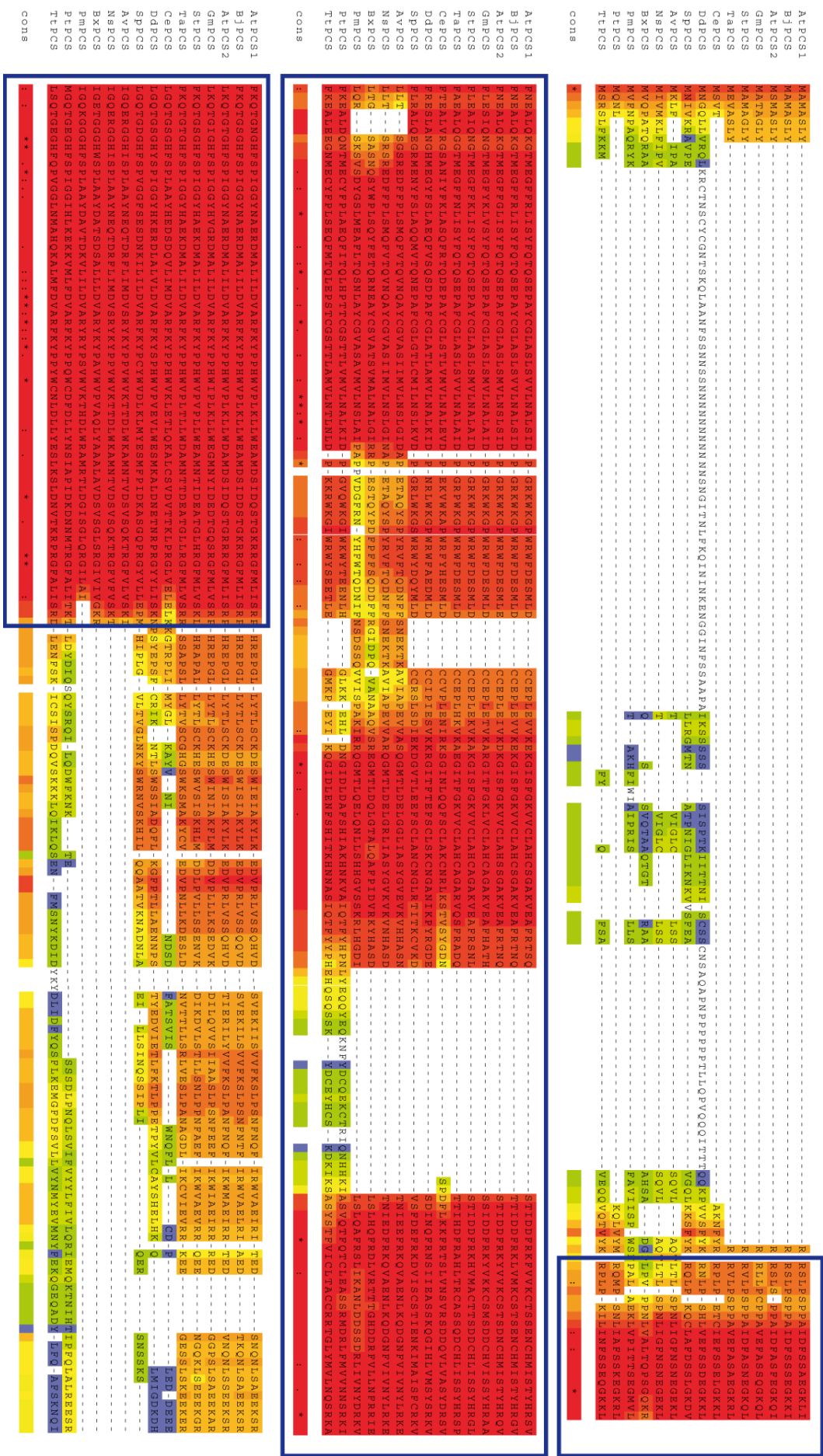
Figura 38. Matriz de identidad obtenida de la comparación entre los dominios N-terminal de la TtΨPCS con FQSS de diferentes organismos eucariotas y procariotas. AtPCS1, AtPCS2: *A. thaliana*. AvPCS: *A. variabilis* ATCC 29413. BjPCS: *B. juncea*. BxPCS: *B. xenovorans* LB400. DdPCS: *D. discoideum*. GmPCS: *G. max*. NsPCS: *Nostoc* sp. PCC7120. PtPCS: *P. tetraurelia*. PmPCS: *P. marinus* str. MIT 9313. SpPCS: *S. pombe*. StPCS: *S. tuberosum*. TtΨPCS: *T. thermophila*. TtPCS: *T. aestivum*.

	AtPCS1	AtPCS2	TaPCS	BjPCS	StPCS	GmPCS	CePCS	SpPCS	DdPCS	TtΨPCS	PtPCS	NsPCS	AvPCS	BxPCS	PmPCS
AtPCS1	100	93,8	86,6	97,2	89,2	85,6	67,4	59,4	40,1	56	56	57,58	57,6	50,12	49,6
AtPCS2		100	85,1	93,8	88,2	86,1	66,8	59,9	39,8	56,8	56,6	57,3	57,3	49,6	49,9
TaPCS			100	86,1	89,2	85,6	67,9	58,1	40,9	55	55,8	57,3	57,3	51,4	51,2
BjPCS				100	90	85,7	67,4	60,2	40,4	56,3	56,3	57,8	57,8	50,1	50,1
StPCS					100	88,9	68,1	58,9	40,9	54,8	56,6	58,9	58,9	51,7	51,2
GmPCS						100	66,6	60	40,9	55,5	57,8	57,6	57,6	51,7	50,4
CePCS							100	59,4	37,5	58,4	58,9	54,5	55,5	50,6	51,7
SpPCS								100	37,8	53,2	50,4	48,6	49,1	46	47,3
DdPCS									100	31,1	27,5	28,3	28,8	24,4	25,7
TtΨPCS										100	67,4	45	45,8	41,1	42
PtPCS											100	45,2	46,5	41	41,6
NsPCS												100	95,6	61,7	62
AvPCS													100	61,4	61,7
BxPCS														100	56,8
PmPCS															100

Figura 39. Matriz de identidad obtenida de la comparación entre los dominios C-terminal de la TtΨPCS con FQSS de diferentes organismos eucariotas y procariotas. AtPCS1, AtPCS2: *A. thaliana*. BjPCS: *B. juncea*. CePCS: *C. elegans*. DdPCS: *D. discoideum*. GmPCS: *G. max*. PtPCS: *P. tetraurelia*. SpPCS: *S. pombe*. StPCS: *S. tuberosum*. TtΨPCS: *T. thermophila*. TtPCS: *T. aestivum*.

	AtPCS1	AtPCS2	TaPCS	BjPCS	StPCS	GmPCS	CePCS	SpPCS	DdPCS	TtΨPCS	PtPCS
AtPCS1	100	76,5	54,9	92,2	61,6	65,4	29,2	59,4	21,6	28,6	28,1
AtPCS2		100	51,4	74,9	57	61,1	35,7	39,5	20,8	36,5	36,2
TaPCS			100	54,3	57,6	59,2	25,1	32,2	17,8	23,8	22,7
BjPCS				100	90	64,32	28,9	35,7	21,6	28,4	28,6
StPCS					100	67,6	26,8	30,8	21,1,9	24,3	22,7
GmPCS						100	26,5	32,4	19,2	25,9	23,5
CePCS							100	38,6	29,5	34,1	42,4
SpPCS								100	23,5	42,7	41,9
DdPCS									100	15,1	14,6
TtΨPCS										100	55,4
PtPCS											100

Figura 40. Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica completa inferida del gen *749PC* con secuencias FQs de otros organismos. La secuencias dentro del cuadro azul corresponden a la región N-terminal conservada empleada para la construcción de los árboles filogenéticos.



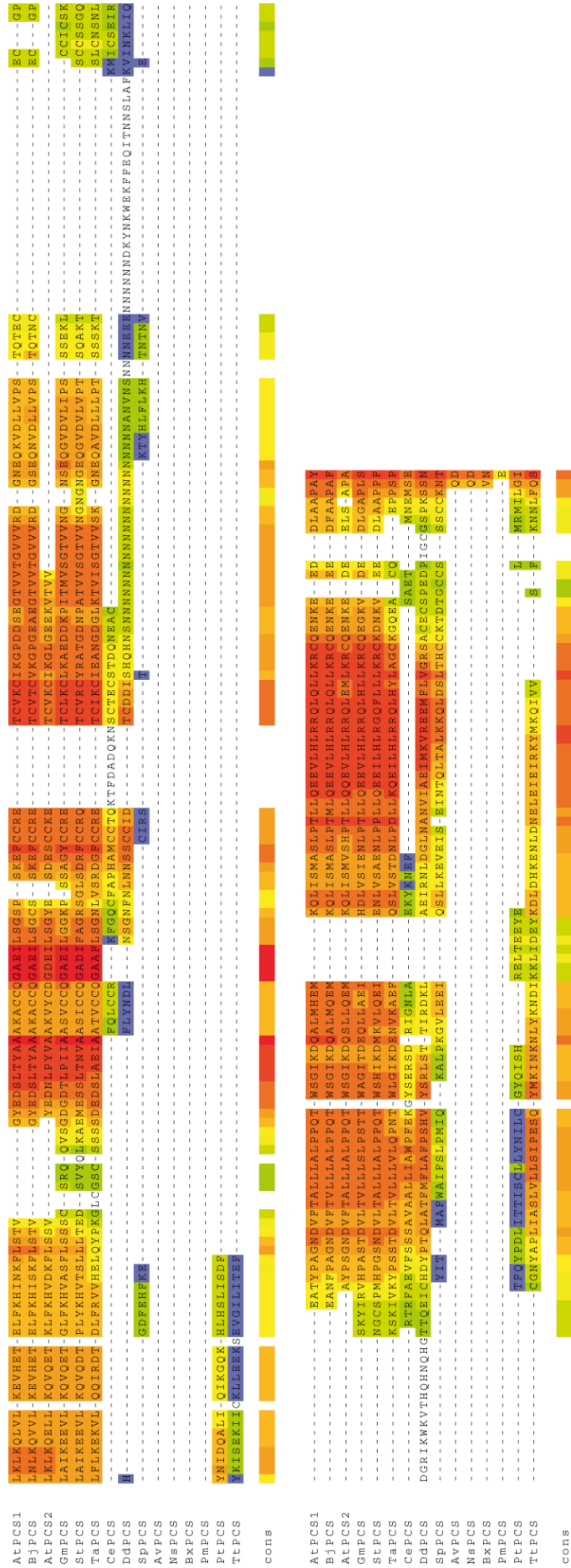


Figura 40. (continuación) Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica completa inferida del gen *TrpYPCS* con secuencias FQs de otros organismos. AtPCS1, AtPCS2: *Arabidopsis thaliana*. AvPCS: *Anabaena variabilis* ATCC 29413. BjPCS: *Brassica juncea*. BxPCS: *Burkholderia xenovorans* LB400. CePCS: *Caenorhabditis elegans*. DdPCS: *Dictyostelium discoideum*. GmPCS: *Glycine max*. NsPCS: *Nostoc* sp. PCC7120. PtPCS: *Paramecium tetraurelia*. PmPCS: *Prochlorococcus marinus* str. MIT 9313. SpPCS: *Schizosaccharomyces pombe*. StPCS: *Solanum tuberosum*. TtYPCS: *Tetrahymena thermophila*. TtPCS: *Triticum aestivum*. La secuencias dentro del cuadro azul corresponden a la región del dominio N-terminal conservado empleada para la construcción de los árboles filogenéticos.

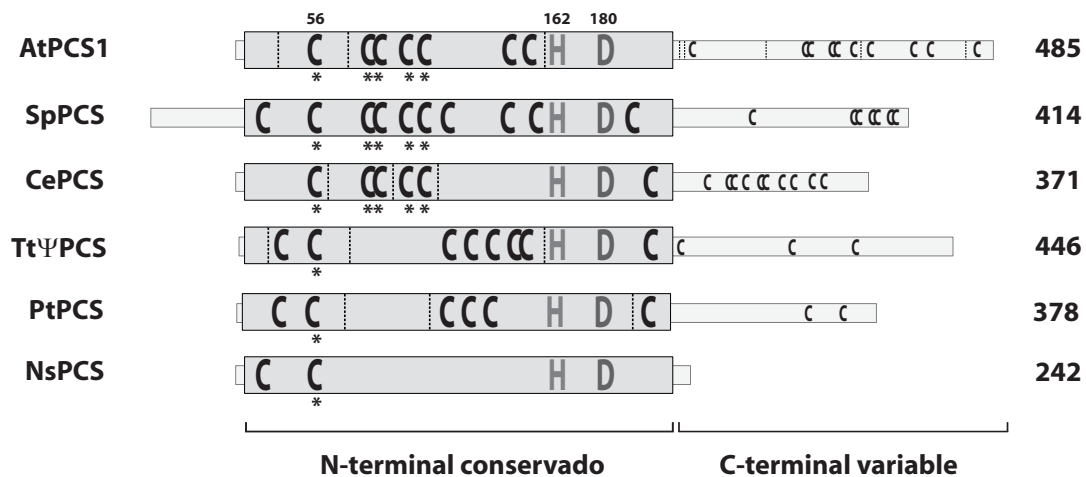
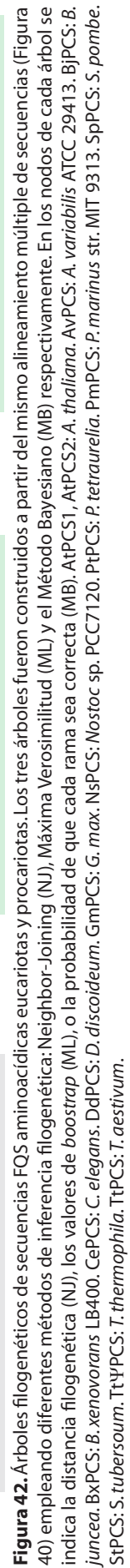


Figura 41. Esquema comparativo de la secuencia aminoacídica de FQs de diferentes organismos. AtPCS1: *A. thaliana*. SpPCS: *S. pombe*. CePCS: *C. elegans*. TtΨPCS: *T. thermophila*. PtPCS: *P. tetraurelia*. NsPCS: *Nostoc* sp. Se indica la posición de los tres residuos (C, H y D) que conforman la triada catalítica de la enzima, así como los residuos de Cys del dominio N-terminal. Las estrellas indican la posición de las 5 Cys conservadas, mientras que las barras verticales discontinuas corresponden a la localización de los intrones en la secuencia nucleotídica. El número total de aminoácidos de cada proteína se muestra a la derecha.

El análisis filogenético se realizó a partir de la región conservada N-terminal de las proteínas FQs (Figura 40). Para ello se llevó a cabo un alineamiento múltiple de las regiones N-terminal de las FQs que fue editado manualmente. La calidad de este alineamiento fue demostrada con la herramienta CORE (Poirot *et al.* 2003), presentando un índice de 71. A partir de este alineamiento se construyó un árbol filogenético empleando el método de máxima verosimilitud (ML, *Maximum Likelihood*) (Figura 42). Para analizar su fiabilidad, este árbol se comparó con los obtenidos mediante otros métodos de inferencia filogenética (NJ, MP y MB) (apartado C.16.1 de MYM). Como se puede ver en la Figura 42, todos los árboles son prácticamente iguales, demostrando la alta credibilidad del árbol propuesto en este trabajo. En todos ellos aparecen dos grupos perfectamente separados: las proteínas procariotas semejantes a FQs, y el grupo de FQs eucariotas, ambos con un origen común. La fiabilidad de esta separación es máxima (valor de *bootstrap* = 1.000, Figura 42). Dentro de las FQs eucariotas, las FQs de ciliados aparecen como un grupo independiente, separado del grupo de organismos en los que se ha descrito la presencia de FQs (*S. pombe*, *C. elegans*, *D. discoideum* y plantas superiores). La fiabilidad de que las FQs de ciliados aparezcan como un grupo separado es también máxima (valor de *bootstrap* = 1.000, Figura 42).



B.3 Análisis de la expresión del gen *TtΨPCS* bajo estrés por metales pesados

Mediante RT-PCR cuantitativa se analizaron los niveles de expresión del gen *TtΨPCS* tras una exposición corta (1 h) o prolongada (24 h) de cultivos de *T. thermophila* a diferentes metales pesados. Al igual que otros genes FQs (Ha *et al.* 1999; Cazale y Clemens 2001), el gen *TtΨPCS* se expresa de forma constitutiva, de modo que se determinó la expresión relativa de este gen respecto a los niveles basales (cultivo control no tratado, cuyo nivel de expresión se fija como 1). Como se muestra en la Figura 43, tras 24 horas de exposición a Cd los niveles de expresión son similares a los niveles basales; mientras que se detecta un aumento de la expresión de aproximadamente 7 veces tras 1 h de exposición a Cd (significativo con $p < 0,001$ respecto del control no tratado). La exposición a otros metales pesados (Cu, Pb o As) apenas induce la expresión del gen, ya sea tras 1 o 24 horas de tratamiento, mostrando que, en general, la expresión del gen *TtΨPCS* no se ve afectada por la presencia de metales pesados (a excepción del Cd).

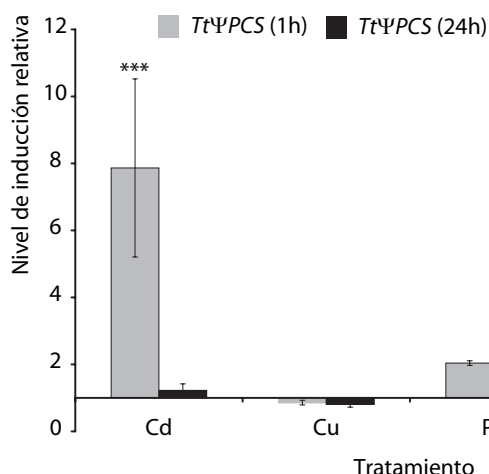


Figura 43. Análisis mediante RT-PCR cuantitativa de los niveles de expresión del gen *TtΨPCS* tras exposición a diferentes metales pesados durante 1 (barras grises) ó 24 horas (barras negras). Las barras representan el nivel de expresión relativa respecto al cultivo control no tratado, y normalizados respecto a la expresión del gen constitutivo α -tubulina. Cada barra corresponde al valor medio \pm la desviación estándar de dos experimentos independientes. Las concentraciones de metales empleadas así como las condiciones de cada tratamiento se indican en la Tablas 8 y 9. ***($p < 0,01$).

B.4 Análisis de la presencia de fitoquelatinas en *T. thermophila*

La presencia de FQs presumiblemente sintetizadas por la proteína *TtΨPCS*, se investigó por diferentes metodologías a partir de extractos celulares de *T. thermophila*: electroforesis capilar, HPLC y espectrometría de masas.

Por electroforesis capilar se analizó la presencia de FQs en extractos celulares obtenidos de cultivos de *T. thermophila* previamente expuestos a Cd $2,67 \times 10^{-5}$ M durante 1 ó 5 días. En el electroferograma obtenido (Figura 44) aparecen dos picos correspondientes al aminoácido Cys y el tripéptido GSH, y una serie de picos que eluyen antes que la Cys, pero que no corresponden a ninguno de los patrones utilizados en la electroforesis (Cys, γ -Glu-Cys, GSH y FQs). Sin embargo, no aparecen moléculas con grupos tiólicos que eluyan posteriormente al GSH y que coeluyan con los patrones de FQs empleados.

Figura 44. Separación por electroforesis capilar de los péptidos con grupos tiólicos presentes en extractos celulares de cultivos de *T. thermophila* expuestos a Cd $2,67 \times 10^{-5}$ M durante 5 días. Cys: Cisteína, GSH: Glutathion.

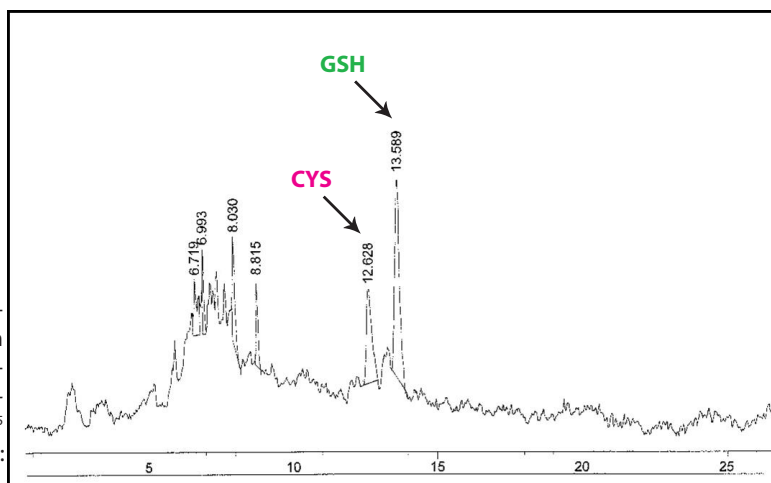
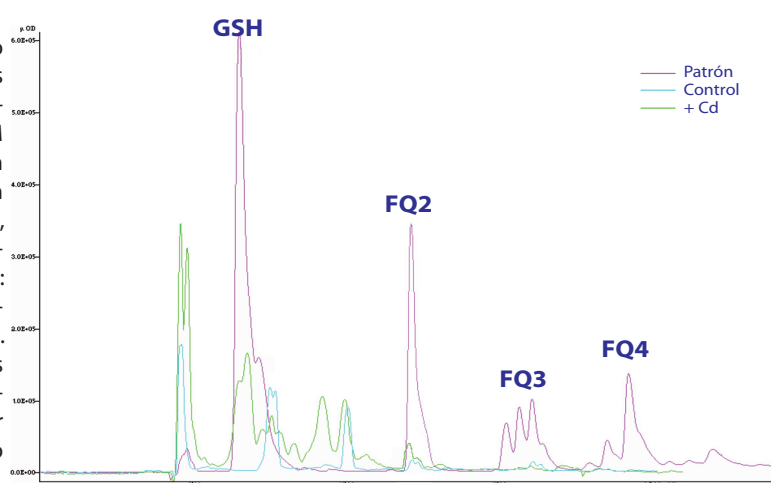


Figura 45. Cromatograma obtenido en el análisis por HPLC de extractos celulares de cultivos de *T. thermophila* expuestos a Cd $2,67 \times 10^{-5}$ M durante 3 días. En violeta aparecen las moléculas patrón cargadas en la columna (GSH, FQ₂, FQ₃ o FQ₄), en azul la muestra control, y en verde la muestra tratada con Cd. FQ₂: fitoquelatina formada por dos repeticiones del dipéptido γ -Glu-Cys. FQ₃: fitoquelatina formada por tres repeticiones del dipéptido γ -Glu-Cys. FQ₄: fitoquelatina formada por cuatro repeticiones del dipéptido γ -Glu-Cys.



El análisis mediante HPLC y espectrometría de masas tampoco mostró la existencia de fitoquelatinas en extractos celulares de cultivos control o tratados con Cd $2,67 \times 10^{-5}$ M durante tres días. Como se muestra en las Figuras 45 y 46, no se detectaron FQs ni en las células control ni en las tratadas con el metal, sugiriendo que *Tt*ΨPCS no sintetiza FQs estándar, incluso tras una exposición prolongada a Cd. Sin embargo, como refleja la Figura 46, en la muestra tratada con Cd se identificaron una serie de picos que no aparecen en la muestra control. De acuerdo a sus perfiles de elución y fragmentación, estos picos fueron identificados como GSH ($m/z=308$), GSH sin Glu ($m/z=179$) y el dipéptido γ Glu-Cys ($m/z=251$).

Un análisis llevado a cabo con anticuerpos anti-FQs, no revelaron, igualmente, resultados positivos que indicaran su presencia en extractos celulares de *T. thermophila* (datos no mostrados).

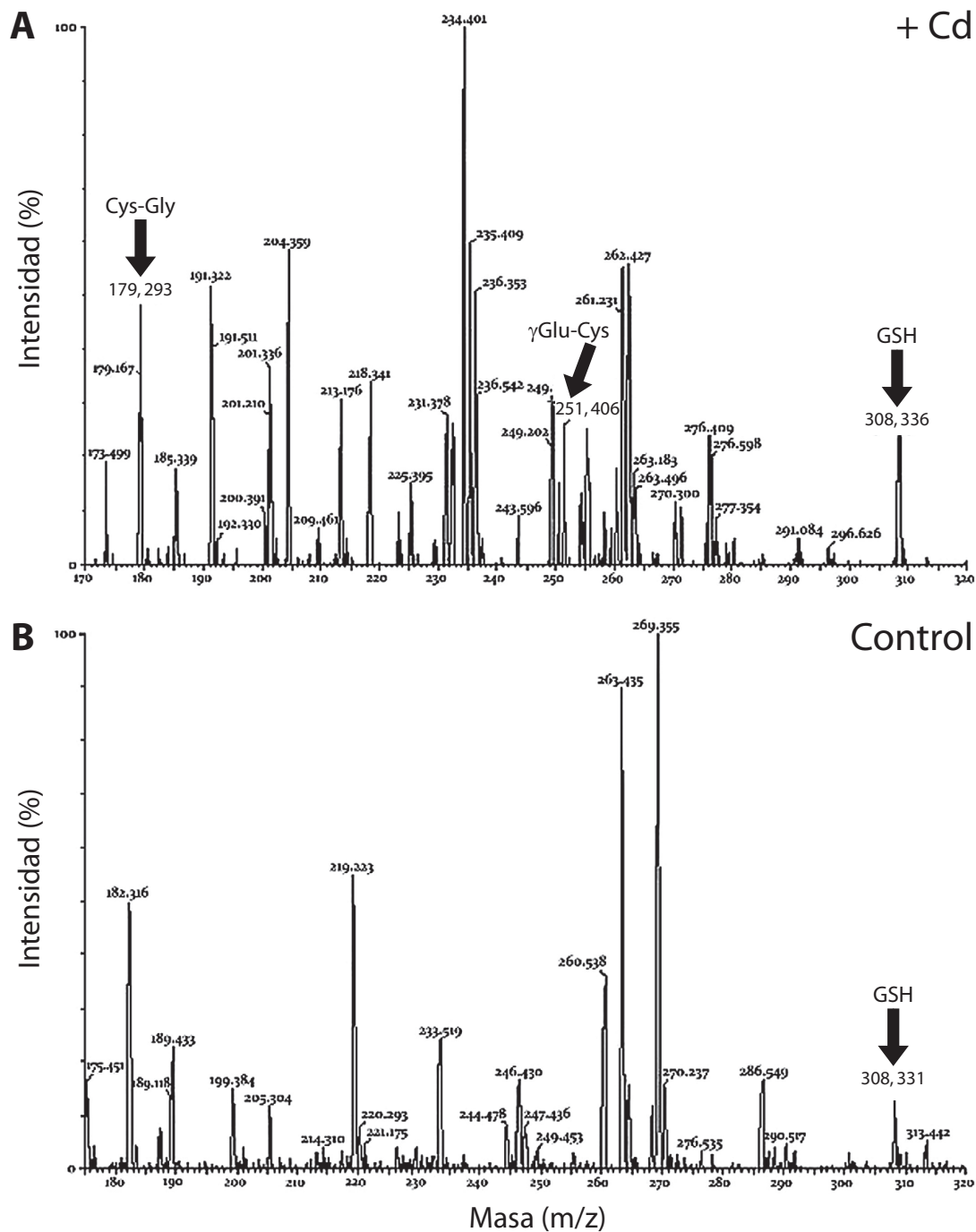


Figura 46. Análisis MS-HPLC de extractos celulares procedentes de cultivos de *T. thermophila* expuestos a Cd $2,67 \times 10^{-5}$ M **(A)** y cultivos control no expuestos al metal **(B)**. Las flechas indican los picos con valores de m/z de 179, 251 y 308 correspondientes a la masa teórica $[M+H]^+$ de GSH sin Glu (o Cys-Gly), γ Glu-Cys y GSH respectivamente.

C. BIOSENSORES CELULARES DE METALES PESADOS BASADOS EN LA UTILIZACIÓN DE PROMOTORES DE GENES DE METALOTIONEÍNAS DE *T. thermophila*

C.1 Biosensores basados en fluorescencia

C.1.1 Construcción de biosensores celulares basados en las proteínas de fusión GFP::MTT5 o GFP::MTT1

C. 1.1.1 Construcciones reporteras pVGF.MTT1 y pVGF.MTT5

Las construcciones reporteras utilizadas en este trabajo fueron desarrolladas a partir del plásmido pVGF.MTT (Figura 47,B3). Este vector contiene la región codificante de la proteína GFP de la medusa *Aequorea victoria*, bajo el control del promotor del gen *TtheMTT1* (P_{MTT1}) de *T. thermophila*. Además presenta un ADN_r que confiere resistencia al antibiótico paramomicina (Pm), que nos permite la selección de las células transformantes.

Para generar la proteína de fusión GFP::MTT1 en primer lugar se amplificó por PCR estándar el ORF de *TtheMTT1* empleando los cebadores MTT1CDSA/MTT1CDSB (Tabla 10), que añaden las dianas de restricción *XhoI* y *Apal* a los extremos 5' y 3' de la región codificante de *TtheMTT1*, respectivamente. El producto de PCR resultante de 507 pb fue clonado en *E. coli* (utilizando para ello el vector *pCR®2.1 TOPO®*, apartado 8.3.1 de MYM), secuenciado e insertado en el sitio específico *XhoI*/*Apal* del vector pVGF.MTT (apartado 8.3.2 de MYM). De esta manera el ORF completo de *TtheMTT1* quedó fusionado al extremo N-terminal de la proteína GFP, ambas bajo el control del promotor de *TtheMTT1* en el plásmido. La proteína de fusión GFP::MTT5 fue generada de manera análoga, empleando en este caso los cebadores MTT5CDSA/MTT5CDSB (Tabla 10), que amplificaron por PCR un fragmento de 318 pb. La fidelidad de todas las construcciones realizadas (P_{MTT1} ::GFP::MTT1 y P_{MTT1} ::GFP::MTT5) (Figura 47, B4 y B5) fue comprobada por secuenciación de las mismas.

Una vez contruidos

Cepa	Construcción plasmídica	Construcción reportera	Fenotipo macronuclear
GFPMTT1	pVGF.MTT1	P_{MTT1} ::GFP::MTT1	pm-R
GFPMTT5	pVGF.MTT5	P_{MTT1} ::GFP::MTT5	pm-R

Tabla 26. Características de las cepas transformadas de *T. thermophila* GFPMTT1 y GFPMTT5, que expresan las construcciones GFP::MTT1 o GFP::MTT5 bajo el promotor de *TtheMTT1* (P_{MTT1}) situado en el plásmido. pm-R: resistencia a paramomicina.

los plásmidos con las construcciones reporteras, éstos fueron introducidos en el macronúcleo de células conjugantes (resultado de cruzar las cepas CU428 y B2086) por electroporación (apartado 10.1 de MYM). La presencia del plásmido además confiere a estas cepas transformadas la resistencia al antibiótico paramomicina, lo que facilita su selección frente aquellas que no recibieron copias plasmídicas. Dependiendo de la construcción introducida, las cepas de *T. thermophila* se denominaron GFPMTT1 (con el pVGFMTT1, que expresa la proteína de fusión GFP::MTT1), o GFPMTT5 (con el pVGFMTT5), que expresa la proteína de fusión GFP::MTT5).

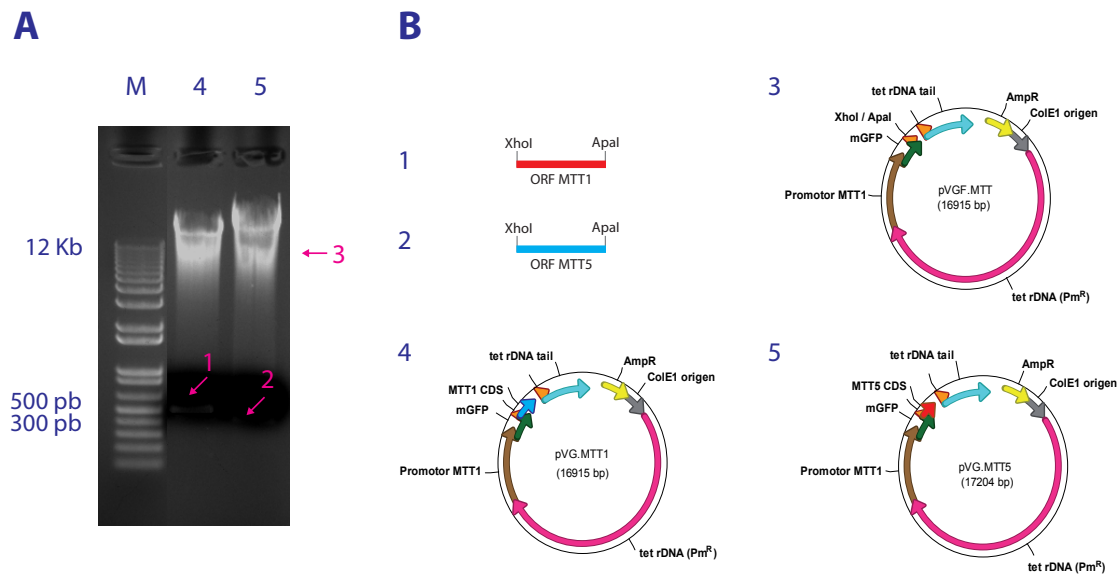


Figura 47. Construcciones pVGF.MTT1 y pVGF.MTT5 **(A):** Construcciones digeridas con las endonucleasas de restricción *XhoI* y *ApaI*. Carril M: marcador de peso molecular M1Kb (Roche). Carriles 4 y 5: construcciones pVGF.MTT1 (dibujo 4) y pVGF.MTT5 (dibujo 5) digeridas con las enzimas *XhoI* y *ApaI* (Fermentas). **(B):** Representación esquemática del vector pVGF.MTT (flecha y dibujo 3), secuencias (ORFs) amplificadas de *TtheMTT1* (flecha y dibujo 1) y *TtheMTT5* (flecha y dibujo 2), y las construcciones definitivas pVGF.MTT1 (dibujo 4) y pVGF.MTT5 (dibujo 5).

C. 1.2 Respuesta del biosensor celular GFPMTT1 o GFPMTT5 al Cd

C.1.2.1 Bioensayo *Turn on*

Para evaluar la respuesta del biosensor celular GFPMTT1 o GFPMTT5 al Cd se desarrolló un ensayo de tipo *turn on* (Figura 48), cuyas condiciones fueron optimizadas para obtener la máxima respuesta. En este ensayo, el Cd que entre en la célula deberá encontrarse en forma biodisponible. Una vez dentro de la célula se activará la expresión de la proteína reportera GFP::MTT1 o GFP::MTT5 vía el promotor de *TtheMTT1* situado en el plásmido pVGFMTT1 o pVGFMTT5 (según la cepa). La fluorescencia emitida por la GFP puede ser fácilmente detectada y cuantificada por microscopía de fluorescencia y/o citometría de flujo (Figura 48, A).

En un ensayo preliminar (Figura 48, B), las células en fase exponencial de crecimiento, fueron expuestas al Cd, ya que se ha descrito que la sensibilidad al Cd durante esta fase es mayor que en fase estacionaria (Larsen 1989). Las soluciones de Cd fueron preparadas en tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8 y la exposición de las células al metal se realizó en el mismo tampón, para que todo el Cd añadido al cultivo se encontrara en forma biodisponible. Como se puede apreciar en las micrografías de microscopía de epifluorescencia mostradas en la Figura 48 B, la presencia de Cd (2h) hace que las células emitan fluorescencia verde (509 nm) frente al control (sin Cd), en la que sólo se detecta una leve fluorescencia basal, probablemente debida a la expresión basal o constitutiva ejercida por el promotor P_{MTT1} localizado en el plásmido.

Una vez demostrada la respuesta positiva de ambas cepas (GFPMTT1 o GFPMTT5) al Cd y su posible utilización como potenciales biosensores celulares, se llevó a cabo un estudio más detallado de las condiciones de expresión utilizando exclusivamente la cepa GFPMTT5.

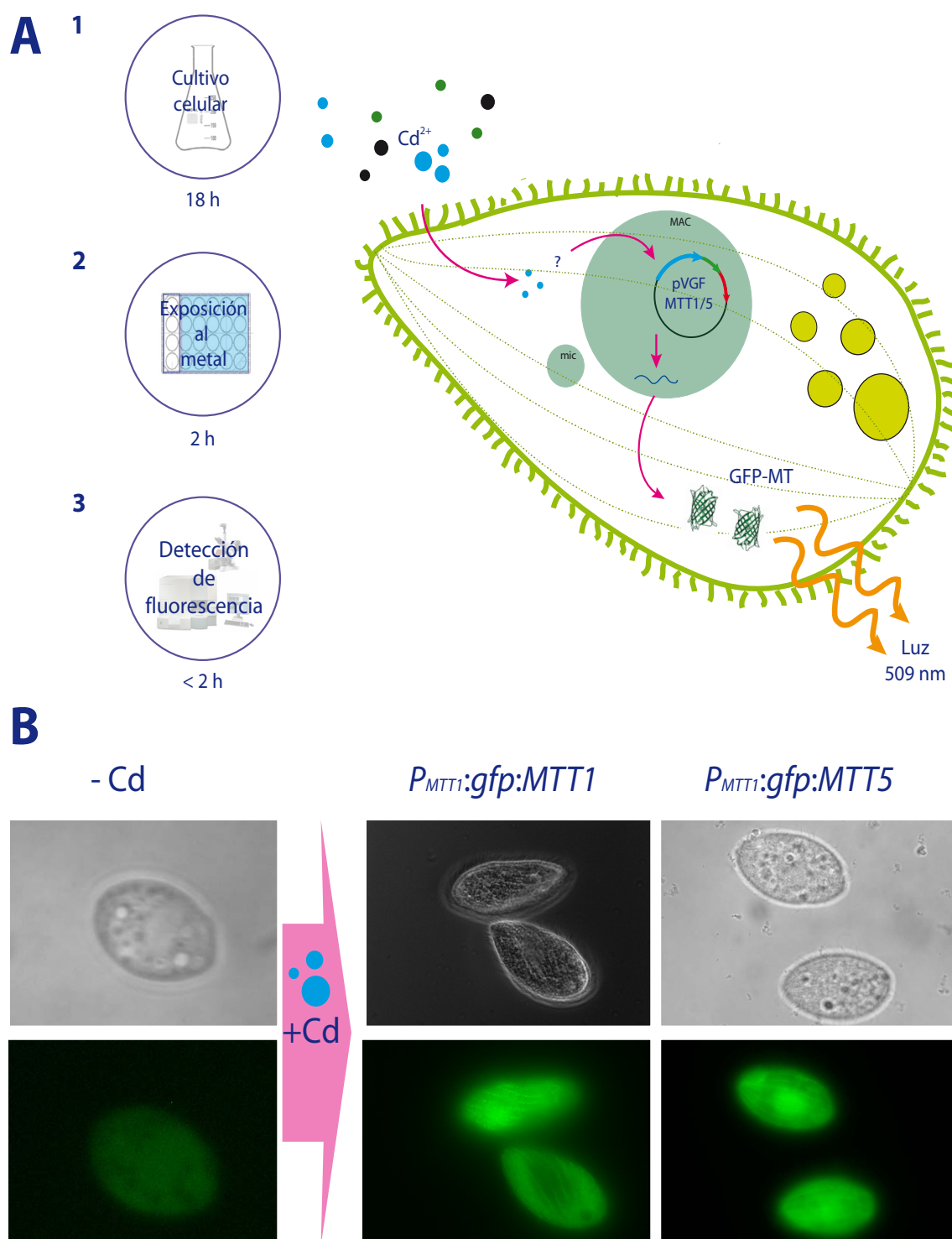


Figura 48. Bioensayo de tipo *turn on* para una evaluación inicial de la respuesta de las cepas GFPMTT1 y GFPMTT5 frente a Cd. **(A):** Representación esquemática del posible funcionamiento del biosensor. El Cd presente en la muestra y que se encuentre en forma biodisponible se introducirá en la célula. Una vez dentro, el Cd activará la expresión de la proteína de fusión GFP::MTT1 o GFP::MTT5, vía el promotor de *TtheMTT1* presente en ambas construcciones. Cuando las células son expuestas a luz de 395 ó 475 nm, la GFP emite fluorescencia en la zona verde (509 nm) del espectro visible que puede ser fácilmente detectada y cuantificada mediante microscopía de fluorescencia o citometría de flujo. **(B):** Microfotografías tomadas por microscopía de epifluorescencia (60x) de las cepas GFPMTT1 o GFPMTT5 expresando las proteínas de fusión GFP::MTT1 o GFP::MTT5 respectivamente, tras ser expuestas a Cd durante 2 horas.

C.1.2.2 Análisis de la respuesta de la cepa GFPMTT5 como biosensor frente a Cd tras 2 horas de exposición

El tiempo de exposición al metal se fijó en 2 horas ya que la proteína GFP requiere un proceso de maduración para ser fluorescente, en el que tiene lugar una serie de reacciones autocatalíticas (Tsien 1998). La señal de fluorescencia producida tras 2 horas de inducción fue suficientemente alta para ser detectada por microcopía de fluorescencia o citometría de flujo, e igualmente cumplía con el requisito de ser un bioensayo de corta duración.

En la Figura 49 se muestra el efecto de diferentes concentraciones de Cd sobre la expresión de la construcción *GFP::MTT5* y la citotoxicidad del metal tras 2 horas de exposición. Cada valor mostrado corresponde a la media de tres experimentos distintos. En ausencia de Cd la expresión de la GFP fue baja (7,4 unidades arbitrarias), correspondiendo a los niveles de expresión basal. A medida que aumentaba la concentración del metal, lo hacía también la fluorescencia de la GFP hasta alcanzar el máximo nivel a $8,90 \times 10^{-7}$ M de Cd (Figura 49, A).

La máxima respuesta/fluorescencia se obtuvo dentro del rango de concentración 5×10^{-7} - $2,67 \times 10^{-6}$ M de Cd. A concentraciones superiores la fluorescencia comenzaba a disminuir debido a la citotoxicidad del metal. A partir de 8×10^{-6} M de Cd se produjo un 50 % de mortalidad celular y la fluorescencia decayó alcanzando los mínimos niveles a $14-15 \times 10^{-6}$ M de Cd. No obstante, la señal obtenida era superior a la basal para todas las concentraciones de Cd testadas. De acuerdo con esta curva dosis-respuesta, la presencia de Cd en el medio podía ser detectado hasta una concentración mínima de $4,45 \times 10^{-7}$ M.

C.1.2.3 Análisis de la respuesta de la cepa GFPMTT5 como biosensor frente a Cd tras 24 horas de exposición

Para analizar el comportamiento del potencial biosensor constituido por la cepa GFPMTT5 a largo plazo y evaluar la acumulación citoplasmática de la proteína de fusión *GFP::MTT5* a lo largo del tiempo, se cuantificaron igualmente los niveles de fluorescencia emitida por el biosensor celular tras 24 horas de exposición a Cd (Figura 49, B). En ausencia del metal, el biosensor presentó un bajo nivel de fluorescencia basal, que se corresponde con la expresión basal de la construcción. La menor concentración que produjo una señal detectable fue $8,9 \times 10^{-8}$ M de Cd. Con concentraciones superiores del metal, la fluorescencia aumentó de modo más o menos lineal hasta $5,23 \times 10^{-6}$ M de Cd. El máximo de fluorescencia se alcanzó a $11,56 \times 10^{-6}$ M de Cd, y a concentraciones superiores la señal comenzaba a disminuir debido a la citotoxicidad del metal. A 14×10^{-6} M de Cd existía una mortalidad celular del 50 %, de modo que la CL_{50} tras 24 horas de exposición de esta cepa GFPMTT5 estaría en torno a este valor.

Si comparamos la resistencia al Cd de esta cepa respecto a la que presenta la cepa SB 1969 de *T. thermophila* con fenotipo salvaje ($CL_{50} = 1,73 \times 10^{-6}$ M (Gallego *et al.* 2007) (Figura 50), se observa que la cepa GFPMTT5 presenta un considerable aumento de la resistencia a

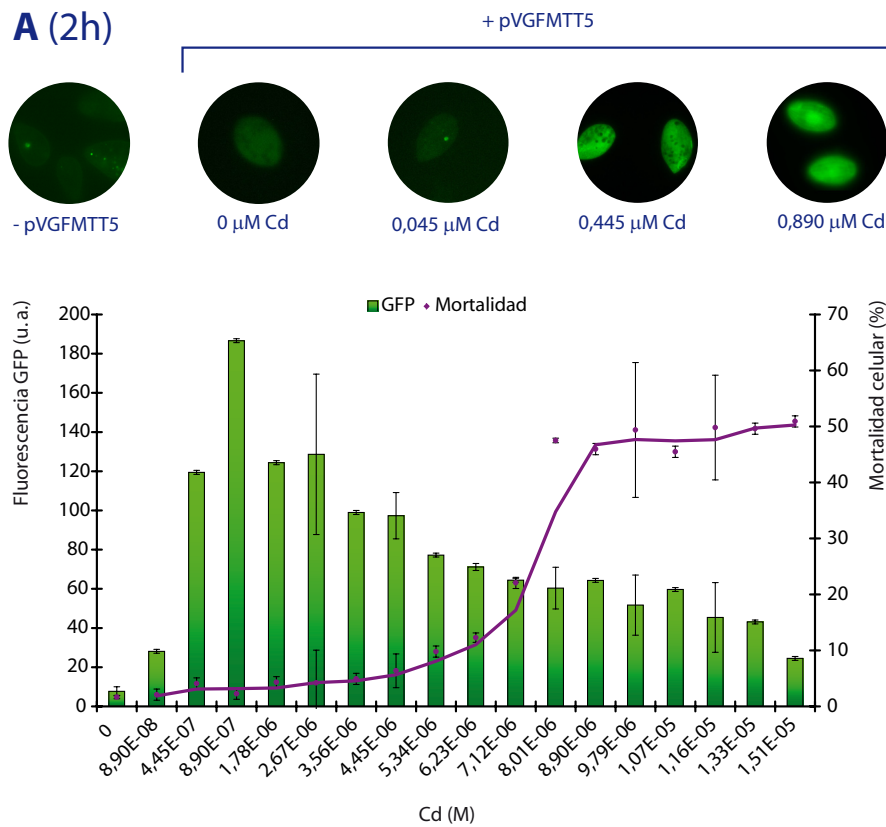
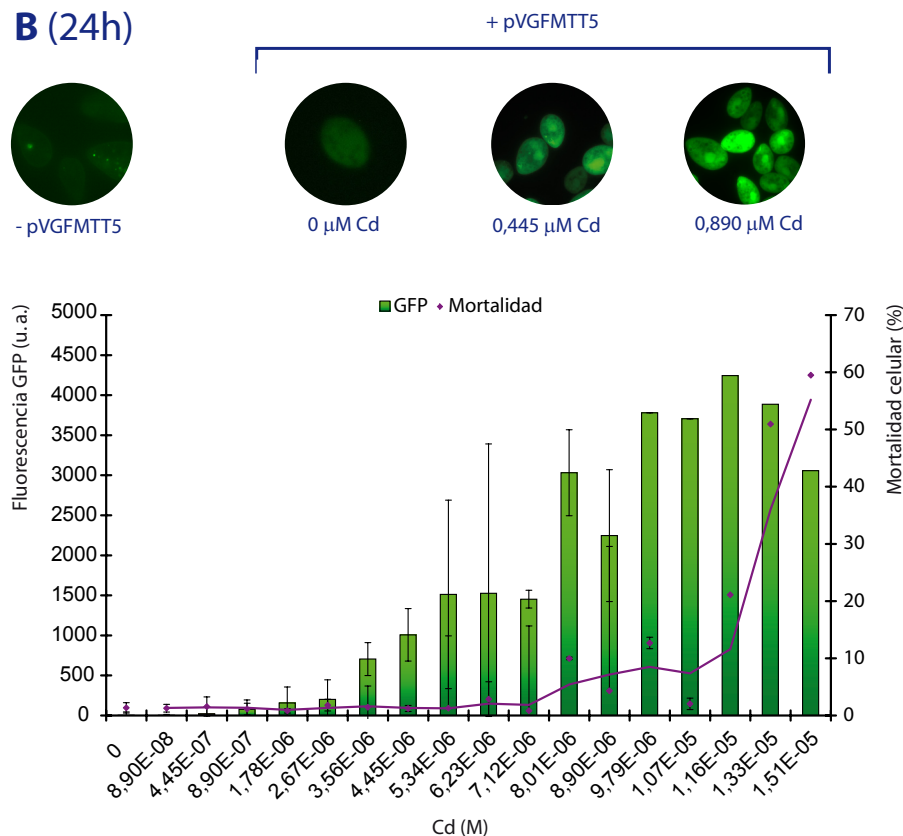
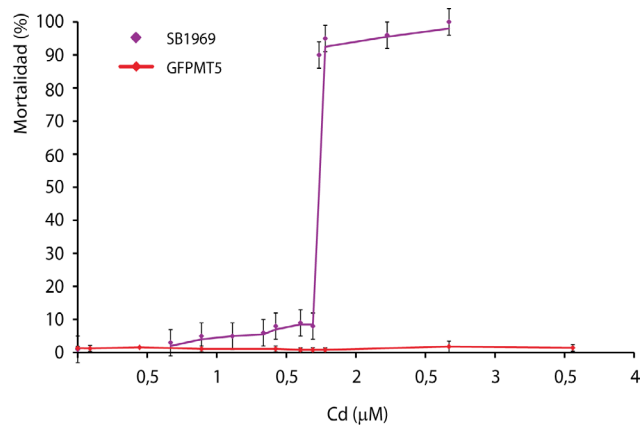
A (2h)**B (24h)**

Figura 49. Respuesta de la cepa GFP_{MTT5} (que contiene la construcción reportera $P_{MTT5}::gfp::MTT5$) frente a Cd. Se muestra el efecto de distintas concentraciones de Cd sobre la expresión de la construcción GFP::MTT5 (barras verdes) y la mortalidad celular (línea púrpura), tras 2 **(A)** ó 24 horas **(B)** de exposición al metal en tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8. La fluorescencia de la proteína GFP y la mortalidad celular fueron determinadas mediante citometría de flujo tal y como se describe en el apartado 13 de MYM. Los valores mostrados corresponden a la media de tres experimentos diferentes.

este metal, unas 10 veces más resistente a Cd. La mayor resistencia a Cd de la cepa GFPMTT5 la hace capaz de detectar la presencia de Cd incluso a altas concentraciones del metal que resultan letales para el fenotipo salvaje (Figura 50).

Figura 50. Mortalidad del Cd sobre las cepas SB1969 (fenotipo salvaje) y GFPMTT5 (biosensor que contiene la construcción $P_{MTT1}::gfp::MTT5$) tras 24 horas de exposición a Cd. En la gráfica se muestra la mortalidad de la cepa GFPMTT5 (línea roja) observada para distintas concentraciones de Cd respecto a la de la cepa salvaje SB1969 (Gallego *et al.* 2007). La mortalidad celular fue determinada mediante citometría de flujo añadiendo yoduro de propidio a las células. La cepa GFPMTT5 presentó una CL_{50} aproximadamente diez veces mayor que la cepa salvaje SB1969.



C.1.2.4 Análisis cuantitativo de la expresión de la construcción *gfp::MTT5* en respuesta a diferentes metales pesados

Para comprobar que la mayor resistencia a Cd de la cepa GFPMTT5 se debía a la sobreexpresión de la construcción *gfp::MTT5*, se llevó a cabo un análisis mediante RT-PCR cuantitativa de los niveles de transcritos *MTT5* y *GFP* originados, tanto en la cepa GFPMTT5 como en la salvaje (SB1969), tras 2h de exposición a Cd (Figura 51).

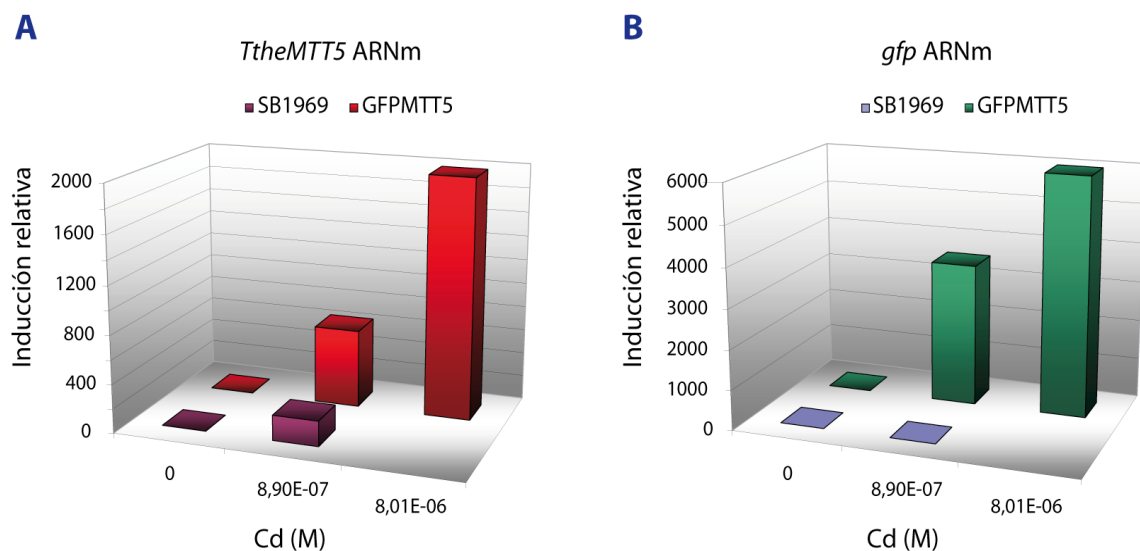


Figura 51. Niveles de transcripción, analizados por RT-PCR cuantitativa, de *TtheMTT5* (A) y *gfp* (B) en las cepas SB1969 y GFPMTT5 tras 2 horas de exposición a Cd en tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8. Las barras representan el nivel de expresión relativa de cada gen respecto al cultivo control no tratado (valor 1), y normalizados respecto a la expresión del gen constitutivo *ATU1* (α -tubulina).

Como refleja el histograma (Figura 51, A), en ambas cepas la expresión de *TtheMTT5* aumentó tras la exposición de las células al Cd ($8,9 \times 10^{-7}$ M). Sin embargo, los niveles de expresión de *TtheMTT5* fueron significativamente superiores en la cepa GFPMTT5, debido a que en

esta cepa la cantidad total de transcritos *TtheMTT5* se deben a la expresión conjunta del gen *MTT5* macronuclear y la construcción *gfp::MTT5* situado en el plásmido pVGFMTT5. La cepa SB1969, en cambio, sólo presenta el gen *TtheMTT5* macronuclear, por lo que ante la misma concentración de Cd, los niveles de ARNm *TtheMTT5* son considerablemente menores (Figura 51, A).

La otra concentración de Cd ensayada (8 μ M) es letal para la cepa no transformada (expresión 0), mientras que la transformante continúa viable, debido a la expresión de *TtheMTT5* potenciada por el metal (inducción de $\sim 2.000\times$ respecto a los niveles basales) (Figura 51, A).

Como control positivo se analizó la expresión del gen *gfp* (que es parte del transcrito originado por la construcción *gfp::MTT5*) (Figura 51, B), que igualmente incrementa su expresión con el aumento de la concentración de Cd, al encontrarse también bajo el control de promotor $P_{MTT1'}$, coincidiendo con los resultados obtenidos por citometría. Sin embargo, los valores de inducción relativa obtenidos para el gen *gfp* son superiores (Figura 51, B) a aquellos obtenidos para *TtheMTT5* (que son la suma del *TtheMTT5* macronuclear y el del plásmido) (Figura 51, A). Probablemente, ello sea debido a que la transcripción de la construcción *gfp::MTT5* no siempre sea completa, que abarque ambos ORFs (*gfp* + *TtheMTT5*), originando así transcritos incompletos con sólo el gen *gfp* (más cerca del promotor) o con parte del *TtheMTT5* (no alcanzando la región donde se localizan los cebadores). Como resultado de ello, se origina mucho más ARNm incompleto con sólo *gfp* amplificable por RT-PCR que del ARNm con ambos *gfp::MTT5* (proteína de fusión completa).

C.2 Biosensores basados en bioluminiscencia

C.2.1 Construcción de biosensores celulares basados en bioluminiscencia

C.2.1.1 Construcciones reporteras $P_{MTT1}::lucFF$ y $P_{MTT5}::lucFF$

Las construcciones reporteras consistían en el gen de la luciferasa de la luciérnaga *Photinus pyralis* (*lucFF*) (como gen reportero) bajo la acción del promotor de *MTT1* (P_{MTT1}) o *MTT5* (P_{MTT5}) del ciliado *T. thermophila* (Figura 52, C), y fueron generadas a partir del vector pBtΔ(−7)Luc (Figura 52, B).

Para generar la construcción $P_{MTT1}::lucFF$, en primer lugar se amplificó la región promotora de *MTT1* utilizando los cebadores MTT1UTRA/MTT1UTRB (Tabla 10), que añaden las dianas de restricción *Bam*HI y *Hind*III a los extremos 5' y 3' de la secuencia promotora del gen *TtheMTT1* (Figura 52, A1). El producto de PCR obtenido (2.491 pb) fue clonado en *E. coli* (utilizando para ello el vector *pCR*®2.1 *TOPO*®, apartado 8.3.1 de MYM), secuenciado y finalmente insertado en el sitio específico *Bam*HI/*Hind*III del vector pBtΔ(−7)Luc (Figura 51, C4); de modo que el gen *lucFF* quedase bajo el control del P_{MTT1} y ambos flanqueados por las regiones 5' y 3' UTR del gen *BTU1-1*, lo que permitiría su inserción en el locus *btu1-1* (alelo β -tubulina 1) de la cepa CU522 de *T. thermophila* mediante recombinación homóloga. A este nuevo plásmido se le denominó pMTT1LucFF (Figura 52, C4).

La construcción $P_{MTT5}::lucFF$ fue generada de manera similar, empleando los cebadores MTT5UTRA/MTT5UTRB (Tabla 10), que dieron lugar a un producto de PCR de 1.521 pb (Figura 52, A2), que fue clonado, secuenciado y finalmente insertado en el sitio *Bam*HI y *Hind*III del vector pBtΔ(−7)Luc (Figura 52, C5). A este segundo nuevo plásmido se le denominó pMTT5LucFF (Figura 52, C5).

C.2.1.2 Cepas recombinantes MTT1Luc y MTT5Luc

Los plásmidos pMTT1LucFF o pMTT5LucFF fueron digeridos con las enzimas *Kpn*I y *Sac*I (Figura 53), lo que liberó las construcciones reporteras $P_{MTT1}::lucFF$ o $P_{MTT5}::lucFF$ respectivamente, las cuales fueron introducidas en el macronúcleo de la cepa CU522 (Tabla 5) mediante transformación biolística (apartado 10.2 del MYM). Una vez introducidas en el genoma macronuclear, estas construcciones recombinan con la región homóloga cromosómica macronuclear 5' y 3'UTR de *BTU1-1* (locus *btu1-1*), incorporándose así al genoma. La cepa CU522 de *T. thermophila* expresa el alelo mutante de la β -tubulina *btu1-1* (el cual presenta la sustitución K350M en el gen *BTU1* codificante de la β -tubulina) que confiere hipersensibilidad al agente estabilizador de microtúbulos denominado paclitaxel (taxol) (Gaertig *et al.* 1994). El genoma de *T. thermophila* presenta otro gen adicional codificante para β -tubulina (*BTU2*), de modo que la disrupción del gen no esencial *BTU1-1* (por recombinación homóloga con los extremos de la

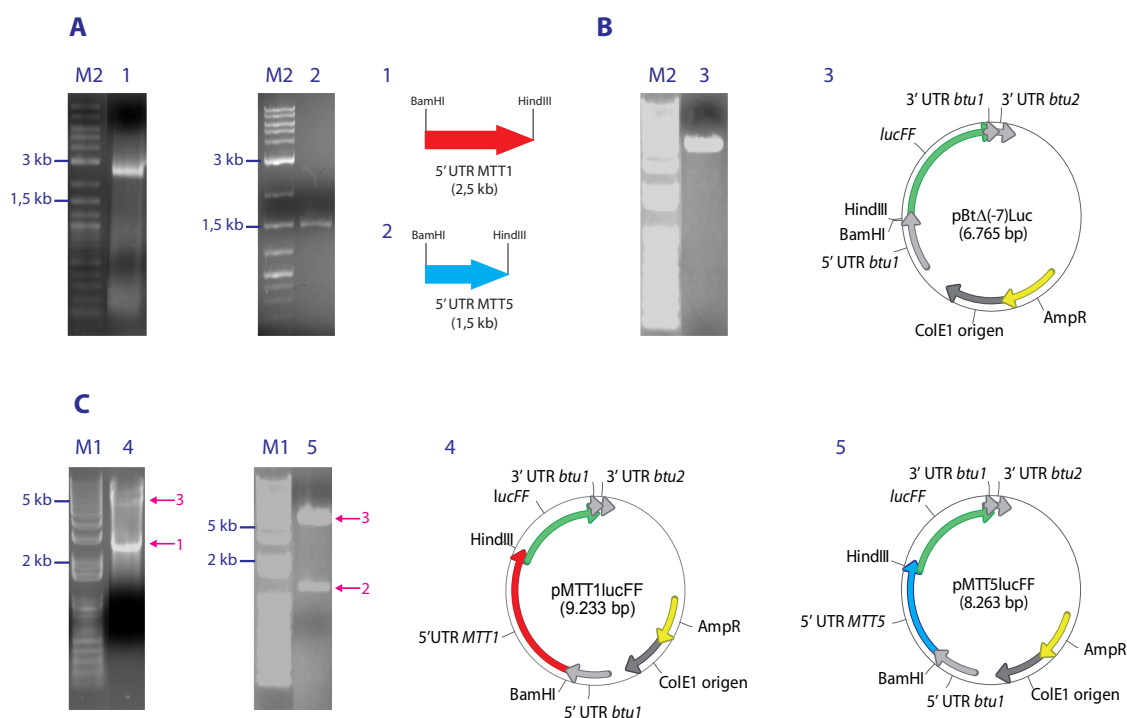


Figura 52. Construcciones plasmídicas pMTT1lucFF y pMTT5lucFF. **(A):** Amplificación por PCR estándar de la región promotora de *TheMTT1* (1) y *TheMTT5* (2) con los juegos de cebadores MTT1UTRA/MTT1UTRB y MTT5UTRA/MTT5UTRB respectivamente, que añaden las dianas *Bam*HI y *Hind*III a los extremos 5' y 3' de cada secuencia promotora (5' UTR). **(B):** Vector pBtΔ(-7)Luc purificado (3). **(C):** Digestión de las construcciones pMTT1lucFF (4) y pMTT5lucFF (5) con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III.

construcción $P_{MTT1}::lucFF$ o $P_{MTT5}::lucFF$) confiere resistencia al paclitaxel como una ventaja para la selección de las células recombinantes. Estas cepas recombinantes fueron denominadas MTT1Luc y MTT5Luc respectivamente (Tabla 27).

La incorporación efectiva de las diferentes construcciones en el locus macronuclear *btu1-1* fue confirmada mediante análisis por PCR, a partir de ADN genómico de las cepas transformantes resistentes a paclitaxel 20 μ M (Figura 54), empleando los cebadores PBtRev y PBtFw (Tabla 10).

La eficacia del proceso de transformación biolística fue superior al 90 % dado que la mayoría de las células eran resistentes al taxol. Sin embargo, debido a que tras el proceso de transformación sólo un número parcial del total de las 45 copias (valor normal de ploidía en *T. thermophila*) del gen *BTU1-1* macronuclear fueron reemplazadas por la construcción, se establecieron líneas clonales (apartado 10.3 de MYM) a partir de algunos transformantes positivos para que, mediante el proceso de segregación fenotí-

Cepa	Genotipo micronuclear	Genotipo macronuclear	Fenotipo macronuclear
MTT1Luc	<i>mpr1/mpr1</i> <i>btu1-1/btu1-1</i>	<i>mpr1</i> <i>btu1-1::P_{MTT1}lucFF</i>	mp-R, pac-R, VI, P _{MTT1} Luc
MTT5Luc	<i>mpr1/mpr1</i> <i>btu1-1/btu1-1</i>	<i>mpr1</i> <i>btu1-1::P_{MTT5}lucFF</i>	mp-R, pac-R, VI, P _{MTT5} Luc

Tabla 27. Características genotípicas y fenotípicas de las cepas recombinantes MTT1Luc y MTT5Luc. *btu1-1*: alelo mutante del gen *BTU1* que confiere hipersensibilidad al paclitaxel (pac-S). *lucFF*: gen que codifica para la luciferasa de *P. pyralis*. *mpr1*: gen de resistencia a 6-metil purina (mp-R). pac-R: resistencia a paclitaxel. P_{MTT1} : promotor de *TheMTT1*. P_{MTT5} : promotor de *TheMTT5*. P_{MTT1} Luc: luciferasa expresada bajo control del promotor de *TheMTT1*. P_{MTT5} Luc: luciferasa expresada bajo control del promotor de *TheMTT5*. En números romanos se indica el tipo conjugante de cada cepa.

Resultados

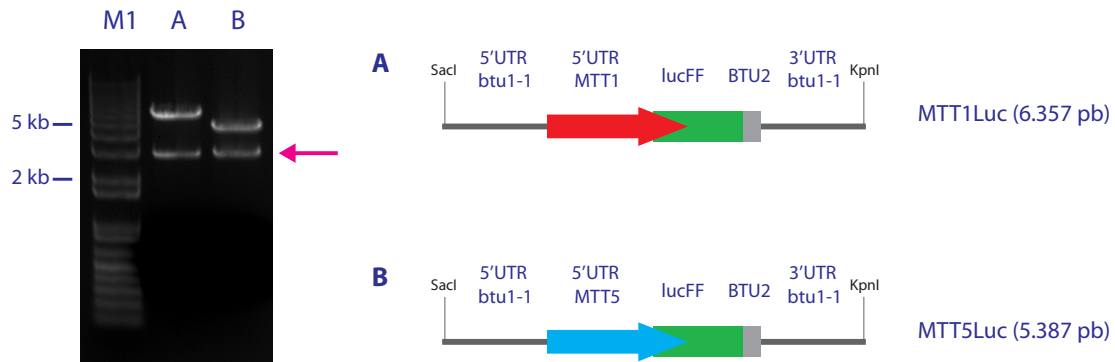


Figura 53. Digestión enzimática de las construcciones plasmídicas pMTT1lucFF y pMTT5lucFF con las endonucleasas de restricción *SacI* y *KpnI*. El fragmento producido en cada caso (A o B), conteniendo la construcción reportera, fue introducido en el macronúcleo de *T. thermophila* cepa CU522 por transformación biolística. El gel muestra los productos generados (flecha) tras la digestión con las endonucleasas de restricción de cada tipo de plásmido: pMTT1lucFF (carril A) o pMTT5lucFF (carril B). M1: marcador M1 kb (Roche). BTU2: secuencia de poliadenilación del gen *BTU2*.

pica macronuclear, se obtuviesen líneas celulares con el 100 % de los alelos *btu1-1* macronucleares reemplazados. Para verificar esto experimentalmente, el ADN genómico total de varias líneas clonales fue analizado mediante PCR estándar empleando los cebadores 5UTRBTU y 3UTRBTU (Tabla 10) (Figura 55). Como control negativo se utilizó ADN genómico total de la cepa CU522. La pareja de cebadores amplificó un fragmento de 2 kb correspondiente al ORF del gen *BTU1-1* del macronúcleo y micronúcleo (minoritariamente) y parte de sus regiones 5' y 3' UTR en la cepa CU522 (Figura 55 A, carril 1) y en los posibles mutantes espontáneos resistentes a paclitaxel (Figura 55 A, carriles 2B y 3B) surgidos durante el proceso de selección (apartado 10.3 de MYM). En cambio, en las líneas clonales donde todas las copias el gen macronuclear *BTU1-1* habían sido supuestamente reemplazadas, se amplificó un fragmento de 4,5 kb ó 3,5 kb correspondiente a cada una de las construcciones reporteras ($P_{MTT1}::lucFF$ o $P_{MTT5}::lucFF$) (Figura 55 A, carriles 2A y 3A), y en menor cantidad el producto de 2 kb probablemente al gen *BTU1-1* micronuclear (Figura 55 A, carriles 2A y 3A).

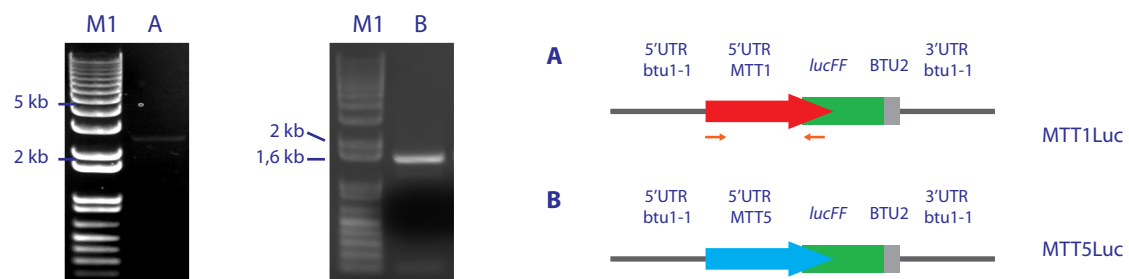


Figura 54. Comprobación por PCR estándar de la incorporación de la construcción reportera ($P_{MTT1}::lucFF$ o $P_{MTT5}::lucFF$) en el locus macronuclear *btu1-1* de los transformantes resistentes a paclitaxel 20 μ M. La obtención del fragmento de aproximadamente 2,5 (carril A) ó 1,5 kb (carril B), amplificado por los cebadores PBtRev y PBtF (flechas naranjas) a partir de ADN genómico total, confirma la presencia de cada tipo de construcción reportera en el macronúcleo de la cepa recombinante. BTU2: secuencia de poliadenilación del gen *BTU2*.

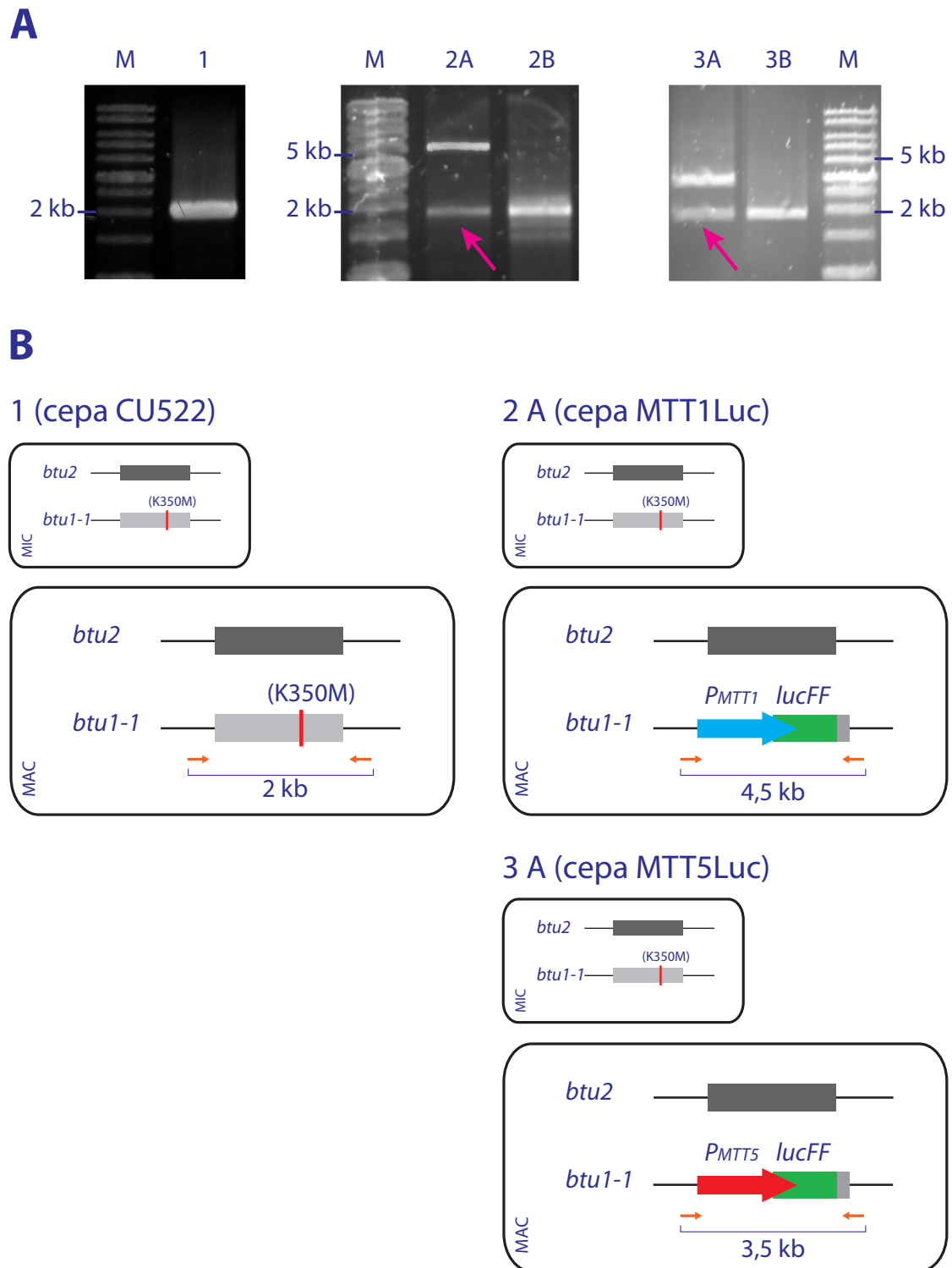


Figura 55. Análisis mediante PCR estándar de los clones resistentes a paclitaxel 50 μ M. **(A):** Productos de PCR amplificados con la pareja de cebadores 5UTRBTU/3UTRBTU (flechas naranjas) a partir de ADN genómico total de las cepas CU522 (carril 1), MTT1Luc (dos clones distintos, carriles 2A y 2B) y MTT5Luc (dos clones distintos, carriles 3A y 3B). La pareja de cebadores amplificó un fragmento de 2 kb correspondiente al ORF del gen *BTU1-1* macronuclear y micronuclear y parte de sus regiones 5' y 3' UTR, en las cepas CU522 (carril 1) (sensible a paclitaxel), y en los mutantes espontáneos resistentes a paclitaxel (carriles 2B y 3B). En las líneas clonales donde todas las copias el gen macronuclear *BTU1-1* han sido reemplazadas se amplificó un fragmento de 4,5 kb ó 3,5 kb correspondiente a la construcción reportera (carriles 2A y 3A), y en menor cantidad el producto de 2 kb correspondiente probablemente al gen *BTU1-1* micronuclear presente en todas las cepas (flechas rosas). **(B):** Representación esquemática del genotipo micronuclear y macronuclear de las cepas CU522 (1), MTT1Luc (2A), MTT5Luc (3A).

C.2.2 Caracterización de la respuesta de las cepas MTT1Luc y MTT5Luc como biosensores celulares

C.2.2.1 Elaboración de un bioensayo de tipo *turn on* para la utilización de estas cepas como biosensores

C.2.2.1.1 Optimización de las condiciones del bioensayo

Para evaluar la respuesta de las cepas MTT1Luc y MTT5Luc para ser utilizadas como biosensores celulares frente a diversas condiciones de estrés, se estableció un bioensayo de tipo *turn on* (Figura 56), cuyas condiciones fueron optimizadas para obtener la máxima respuesta en el mínimo tiempo posible.

La exposición de las células (cultivos en fase exponencial de crecimiento) al metal se llevó a cabo a 30 °C durante 2 horas en tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8, con el fin de que todo el metal presente en la muestra se mantuviese en forma biodisponible. (ver apartado C.3.1 de D). Según la cinética de inducción de la expresión de luciferasa en respuesta a Cd en la cepa MTT5Luc (Figura 57) el tiempo óptimo de exposición era de 2 horas (120 min), ya que es la exposición más corta para la que se obtienen los máximos valores de luminiscencia/actividad luciferasa. Tras 3 horas de exposición al Cd, la cantidad de luz emitida por la cepa MTT5Luc resultó prácticamente similar a la observada tras 2 horas (Figura 57). Por lo tanto, se decidió fijar el tiempo de exposición al metal a 2 horas para los bioensayos con ambas cepas MTT5Luc y MTT1Luc.

El fundamento del biosensor y el bioensayo a ser aplicado se esquematiza en la Figura 56. Solamente el metal que se encuentre en forma biodisponible en el medio se introducirá en el citoplasma del biosensor (cepa MTT1Luc o MTT5Luc), y activará la transcripción del gen reportero *lucFF* vía el promotor de los genes *TtheMTT1* o *TtheMTT5*, dependiendo de la cepa. La cantidad de enzima luciferasa producida será proporcional a la cantidad de luz emitida por la reacción que cataliza al añadir el sustrato D-luciferina, y se podrá cuantificar mediante un luminómetro (apartado 14 del MYM).

C.2.2.1.2 Cuantificación de la actividad luciferasa *in vivo* e *in vitro*

Para cada biosensor (cepas MTT1Luc y MTT5Luc) se comparó también la actividad luciferasa (bioluminiscencia) medida *in vivo* o *in vitro* en respuesta a distintas concentraciones de Cd, obteniéndose patrones de inducción similares en ambos casos (Figura 58, A y B). Aunque los máximos valores de bioluminiscencia se alcanzan, para ambas cepas, aproximadamente en las mismas concentraciones de Cd ($2,5 \times 10^{-7}$ M), existe una diferencia cuantitativa fundamental entre ambas cepas. Los valores de coeficiente de inducción (para la misma concentración de Cd) son más del doble para la cepa MTT5Luc que para MTT1Luc (Figura 58, A y B). Igualmente

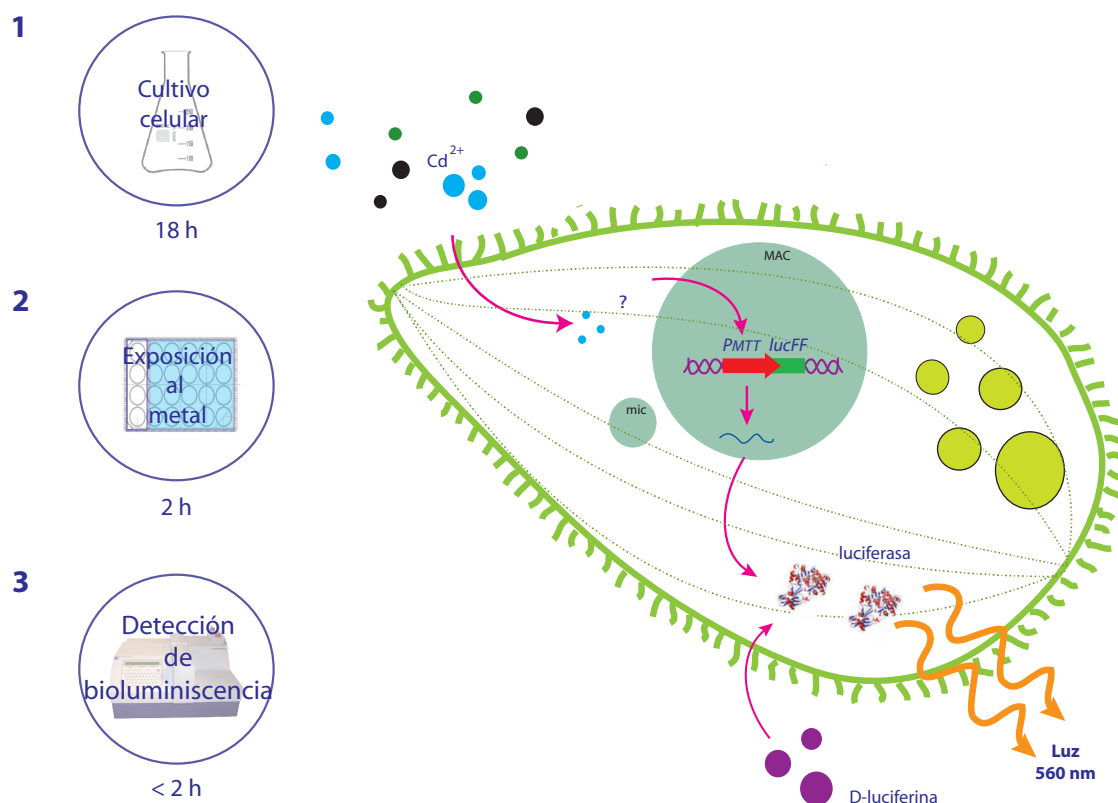
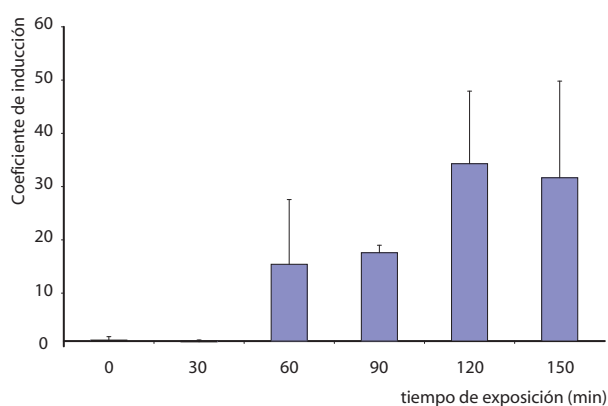


Figura 56. Esquema del bioensayo de tipo *turn on* propuesto para la utilización de las cepas MTT1Luc y MTT5Luc como biosensores celulares de metales pesados. Una vez que el metal entra en la célula, activará la transcripción del gen reportero *lucFF*, vía el promotor de los genes *TtheMTT1* o *TtheMTT5*. La expresión de la enzima luciferasa puede detectarse añadiendo el sustrato D-luciferina y cuantificando la luz emitida por la reacción en un luminómetro. De este modo, el biosensor celular puede detectar la presencia de metales biodisponibles en la muestra problema en menos de 4 horas.

Figura 57. Efecto del tiempo de exposición a Cd en la respuesta del biosensor MTT5Luc. Las barras representan el coeficiente de inducción de actividad luciferasa para la cepa MTT5Luc, tras ser expuesta a Cd (5×10^{-7} M) en tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8 durante los diferentes tiempos ensayados (min). Los datos corresponden al valor medio de dos experimentos diferentes. El coeficiente de inducción fue calculado como el cociente entre la luz emitida por las células expuestas a Cd y las que no fueron expuestas al metal (control) como se describe en el apartado 14.1 de MYM.



se comprobó que también era posible cuantificar la bioluminiscencia *in vivo* de los biosensores en respuesta al metal añadiendo solamente a las células el reactivo de la enzima luciferasa (D-luciferina), sin necesidad de romper las células. Los niveles de bioluminiscencia observados *in vivo* eran similares a los detectados en la cuantificación *in vitro* (Figura 58, A y B), y además tras la obtención de la medida en el luminómetro las células continuaban perfectamente viables.

También se cuantificó la bioluminiscencia en respuesta al Cd en células permeabilizadas con Triton X-100 y DMSO (apartado 14.3 de MYM) comparándose con las medidas obtenidas *in vitro* e *in vivo* (Figura 58, C y D). El patrón de inducción de la actividad luciferasa obtenido

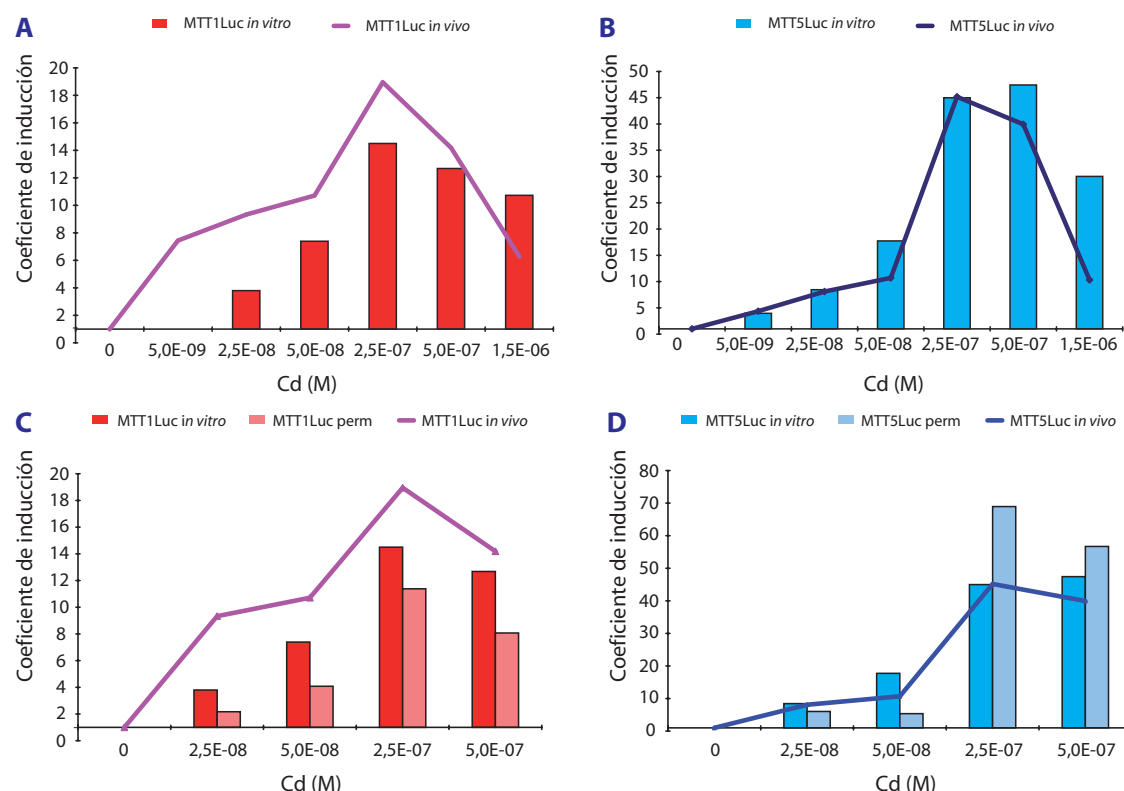


Figura 58. Bioluminiscencia medida *in vivo* e *in vitro* de las cepas MTT1Luc (**A**) y MTT5Luc (**B**) en respuesta a diferentes concentraciones de Cd durante 2 horas de exposición en tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8. (**C y D**): Bioluminiscencia medida *in vitro*, *in vivo* y en células permeabilizadas (perm). El coeficiente de inducción fue calculado como el cociente entre la luz emitida por las células expuestas a Cd y las que no fueron expuestas al metal (control) como se describe en el apartado 14 de MYM.

tras la permeabilización celular fue similar al detectado mediante las otras metodologías. Sin embargo, las células tras su permeabilización no continuaban viables después del bioensayo, ya que minutos después de la permeabilización comenzaban a estallar.

A pesar de los buenos resultados obtenidos de las medidas *in vivo*, se eligió cuantificar la bioluminiscencia *in vitro* porque permitía normalizar la actividad luciferasa de diferentes muestras respecto al contenido de proteína total celular, haciendo así los resultados más comparables. Además, empleando un kit comercial (apartado 14.1 de MYM) para la medida de bioluminiscencia *in vitro*, se consiguió que la reacción (de tipo “flash”) catalizada por la enzima luciferasa fuese más estable y prolongada en el tiempo.

C.2.2.2 Respuesta de los biosensores a distintos agentes inductores de estrés celular

Para evaluar el efecto de distintos agentes estresantes sobre la expresión de las construcciones $P_{MTT1}::lucFF$ y $P_{MTT5}::lucFF$, y la potencial aplicación de las cepas MTT1Luc y MTT5Luc como biosensores celulares de metales pesados, ambas cepas recombinantes fueron expuestas a distintas concentraciones de diferentes metales pesados y otros agentes inductores de estrés celular.

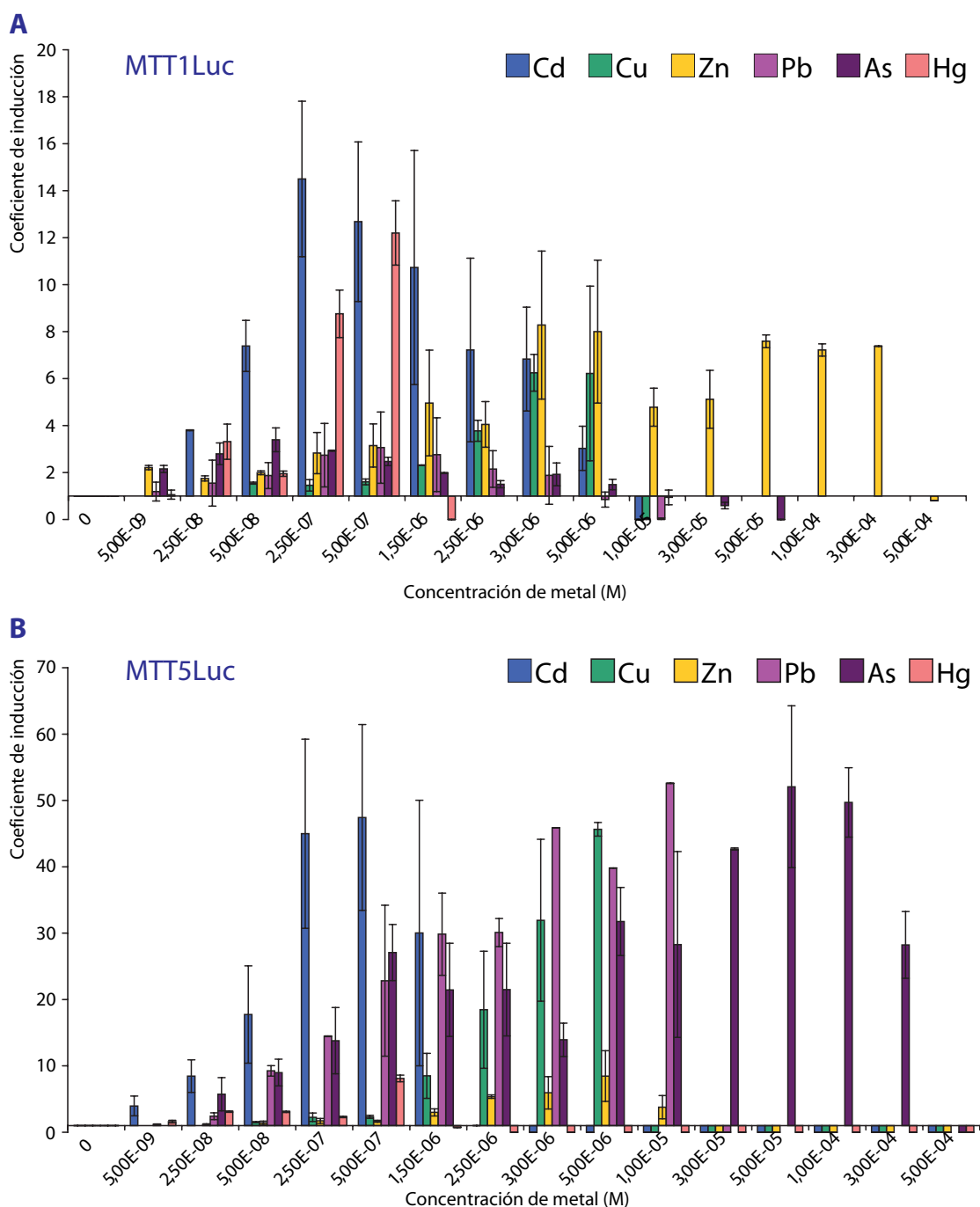


Figura 59. Respuesta de las cepas biosensoras MTT1Luc (A) y MTT5Luc (B) a distintas concentraciones de diferentes metales pesados, tras 2 horas de exposición en tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8. El coeficiente de inducción fue calculado como el cociente entre la luz emitida por las células expuestas y las no expuestas al metal (control), como se describe en el apartado 14.1 de MYM. Los datos corresponden a los valores promedio de 3 experimentos independientes.

C.2.2.2.1 Metales pesados

En la Figura 59 se muestra el comportamiento de las cepas biosensoras en respuesta a distintas concentraciones de varios metales pesados (Cd, Cu, Zn, Pb, As o Hg). Los resultados mostraron que los niveles de expresión del gen *lucFF* bajo el control de los promotores de

TtheMTT1 o *TtheMTT5* son dependientes del tipo de metal y de la concentración del mismo. En general, se observó que la bioluminiscencia aumentaba a medida que se incrementaba la concentración de metal hasta alcanzar los máximos niveles a una concentración de metal determinada, por encima de la cual la señal comenzaba de nuevo a decaer a consecuencia de la citotoxicidad del metal (Figura 59). La mayoría de los metales testados produjeron un aumento significativo de la señal de bioluminiscencia en ambas cepas, incluso a concentraciones muy bajas de metal que no afectaron a la viabilidad celular. El Cd fue el metal que causó un mayor incremento en la cantidad de luz emitida en ambas cepas. La señal de bioluminiscencia aumentó desde $5-25 \times 10^{-9}$ M de Cd hasta alcanzar los máximos niveles a 5×10^{-7} M de Cd. A concentraciones superiores la señal disminuyó a consecuencia de la citotoxicidad del metal (Figura 59).

Sin embargo, las dos cepas biosensoras presentaron tanto patrones de inducción de la actividad luciferasa diferentes, como niveles de expresión distintos en respuesta a los mismos tratamientos con metales pesados. La cepa MTT5Luc (Figura 59, B) incrementó su señal de bioluminiscencia ~10-60 veces los niveles basales, mientras que la cepa MTT1Luc lo hizo ~2-18 veces (Figura 59, A), corroborando de nuevo las diferentes “fuerzas” de los dos promotores de MTs. Los menores incrementos de bioluminiscencia para la cepa MTT5Luc se registraron para el Zn y el Hg (Figura 59, B), que no consiguieron aumentar la señal por encima de 10 veces los niveles basales para ninguna de las concentraciones ensayadas. En cambio, la cepa MTT1Luc sólo respondió a la presencia de Cd, Zn, Cu o Hg; mientras que el tratamiento con Pb o As apenas incrementó la señal de bioluminiscencia de este biosensor. Existiendo así un comportamiento diferencial de ambos promotores que configuran ambas cepas biosensoras.

La concentración mínima detectable de metal para ambas cepas fue del orden de magnitud de 5-50 nM para los metales pesados no esenciales (Cd, Pb, As, Hg), y 1 mM para los esenciales (Zn, Cu) (Tabla 28). No obstante, la sensibilidad de detección de la cepa MTT5Luc fue mayor que la de MTT1Luc para todos los metales analizados (Tabla 28). MTT5Luc respondió a concentraciones más bajas de metal, alcanzado además niveles de bioluminiscencia mayores. Los metales indujeron la expresión de la luciferasa (gen reportero del biosensor) a concentraciones muy por debajo de sus CL_{50} , por lo que ni el número ni la viabilidad celular se vieron afectadas.

Metal	Concentración (M) mínima detectable	
	Cepa MTT1Luc	Cepa MTT5Luc
Cd	$25-50 \times 10^{-9}$	$5-25 \times 10^{-9}$
Cu	$2,5 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6}$
Zn	$0,5 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6}$
Pb	$0,5 \times 10^{-6}$	50×10^{-9}
As	50×10^{-9}	25×10^{-9}
Hg	25×10^{-9}	25×10^{-9}

Tabla 28. Sensibilidad de detección de las cepas biosensoras MTT1Luc y MTT5Luc frente a diferentes metales pesados. Se indica la concentración mínima (M) de cada metal que los biosensores pueden detectar tras 2 horas de exposición al metal en tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8.

C.2.2.2.2 Mezclas de metales

Dado que los vertidos de metales en el medio ambiente generalmente involucran a

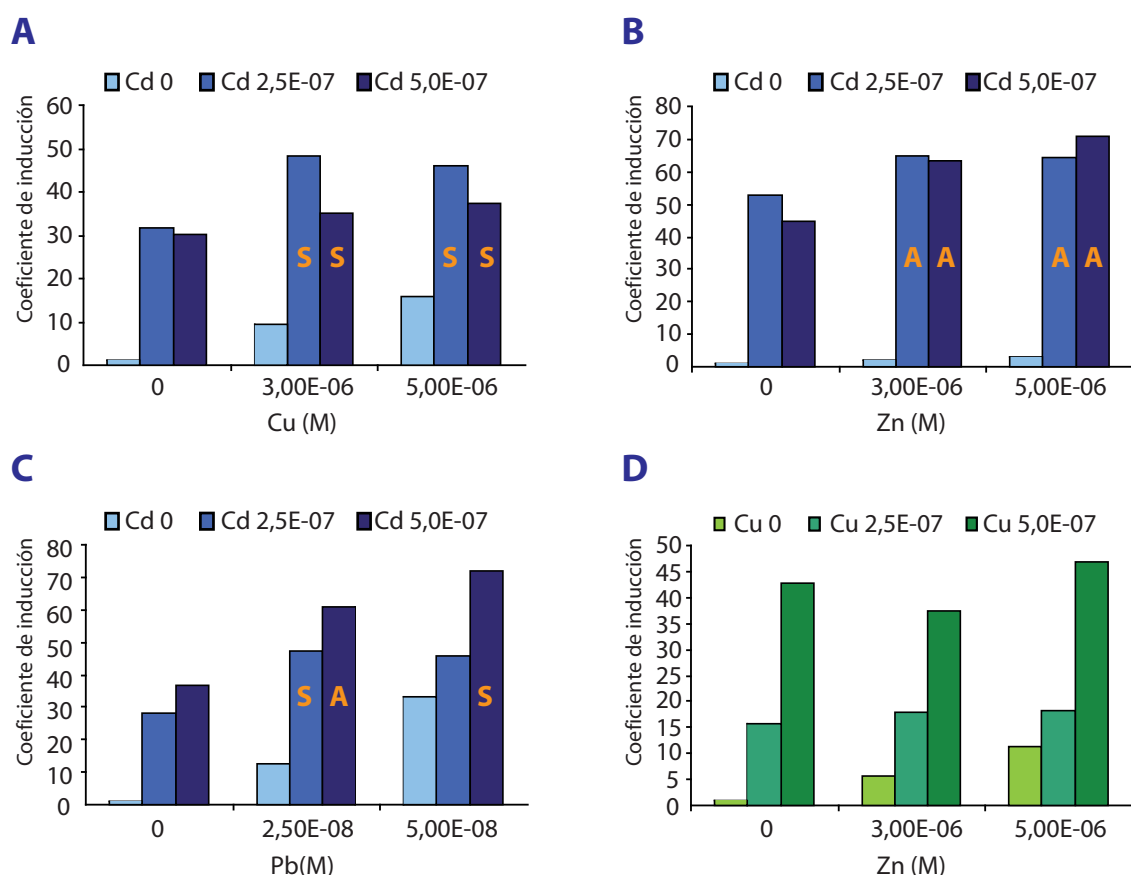


Figura 60. Respuesta de la cepa biosensora MTT5Luc a diferentes mezclas bimetálicas: Cd+Cu (**A**), Cd+Zn (**B**), Cd+Pb (**C**) y Cu+Zn (**D**), en tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8. El tipo de interacción entre los metales sobre la luminiscencia (cuantificación *in vitro*) emitida por el biosensor se indica como A (interacción de tipo aditivo) o S (sinérgica). El coeficiente de inducción fue calculado como el cociente entre la luz emitida por las células expuestas y las no expuestas al metal (control) (apartado 14.1 de MYM).

más de un metal, se analizó también la respuesta del biosensor MTT5Luc (cepa con mayor nivel de sensibilidad de detección y mayores niveles de expresión) frente a varias mezclas de distintos metales pesados (Figura 60). En general, se observó que cuando el biosensor era expuesto a una mezcla bimetálica, incrementaba más su bioluminiscencia respecto de aquella registrada cuando se utilizaba cualquiera de los dos metales por separado. Sin embargo, la mezcla Cu + Zn produjo un incremento en la expresión de la luciferasa similar al que producía el Cu por separado (Figura 60, D).

Para las mezclas conteniendo Cd, la adición del segundo metal supuso un incremento de 5-40 veces más de la luminiscencia obtenida sólo con el Cd, dependiendo del segundo metal y su concentración. Los máximos niveles de bioluminiscencia se observan para las mezclas Cd + Pb y Cd + Zn (70 veces los niveles basales) (Figura 60, B y C).

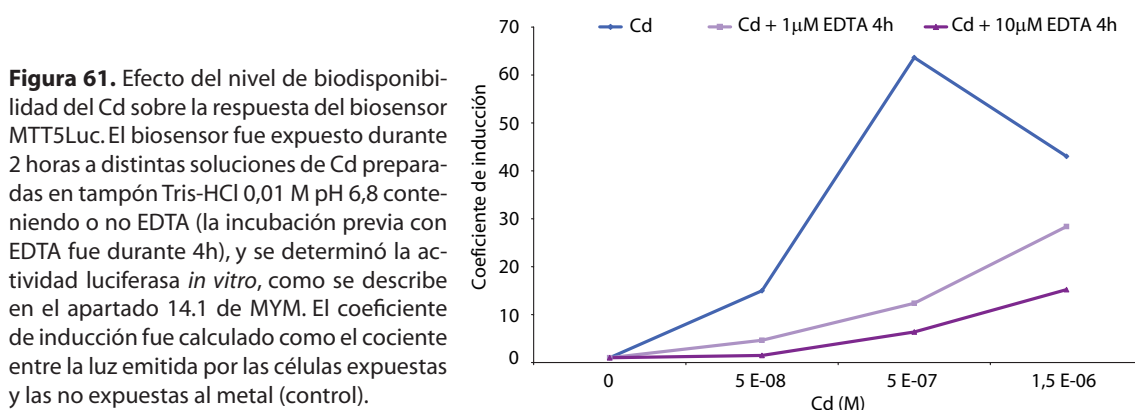
Para aquellos casos en que la inducción de la expresión de luciferasa debida a la mezcla de dos metales era superior a la inducción que causaba cada metal por separado, se determinó que entre los dos metales se establecía una interacción de tipo aditivo (indicada con la letra A en las barras del histograma de la Figura 60). Sin embargo, en los casos en que la inducción debida a la mezcla de metales era igual a la suma de la inducción causada por cada

metal por separado, se determinó que la interacción entre los dos metales era de tipo sinérgico (indicada con la letra S en las barras del histograma en la Figura 60). El tipo de interacción observada dependía del metal y su concentración. Entre Cd y Cu se estableció una interacción de tipo sinérgica sobre el nivel de luminiscencia del biosensor (Figura 60, A), mientras que entre Cd y Zn era claramente de tipo aditivo (Figura 60, B) para todas las concentraciones ensayadas. Por otro lado Cd y Pb interaccionaron de forma aditiva o sinérgica, dependiendo de la concentración de cada metal (Figura 60, C).

C.2.2.2.3 Biodisponibilidad de los metales

Con el fin de comprobar que el biosensor detecta exclusivamente metal biodisponible, se realizó un ensayo en el que las células fueron expuestas a soluciones que contenían diferentes concentraciones de Cd a las que se les había añadido previamente o no un agente quelante (EDTA), y se incubó la solución metálica con EDTA durante 4h. Como se esperaba, la adición del EDTA disminuyó la biodisponibilidad del Cd en la muestra, a juzgar por el descenso del nivel de bioluminiscencia detectado (Figura 61).

En ausencia del agente quelante, la expresión de luciferasa aumentó hasta alcanzar el máximo nivel de inducción (60 veces respecto del basal) a una concentración de Cd de 5×10^{-7} M. En cambio, las mismas concentraciones de Cd tratadas previamente con EDTA, no indujeron la expresión de la luciferasa al mismo nivel (sólo 20 veces respecto del basal) (Figura 61). La adición de EDTA a las soluciones de Cd supuso una reducción de la actividad luciferasa del 60-90 %. Además, la presencia de EDTA 10 μ M fue suficiente para reducir la biodisponibilidad total del Cd a 5×10^{-8} M, produciéndose una señal de bioluminiscencia semejante a la basal (en ausencia de metales) (Figura 61).



C.2.2.2.4 Otros agentes de estrés celular

Para analizar el nivel de especificidad de los biosensores se estudió la respuesta de las cepas MTT1Luc y MTT5Luc frente a agentes que causan estrés celular diferentes a los metales

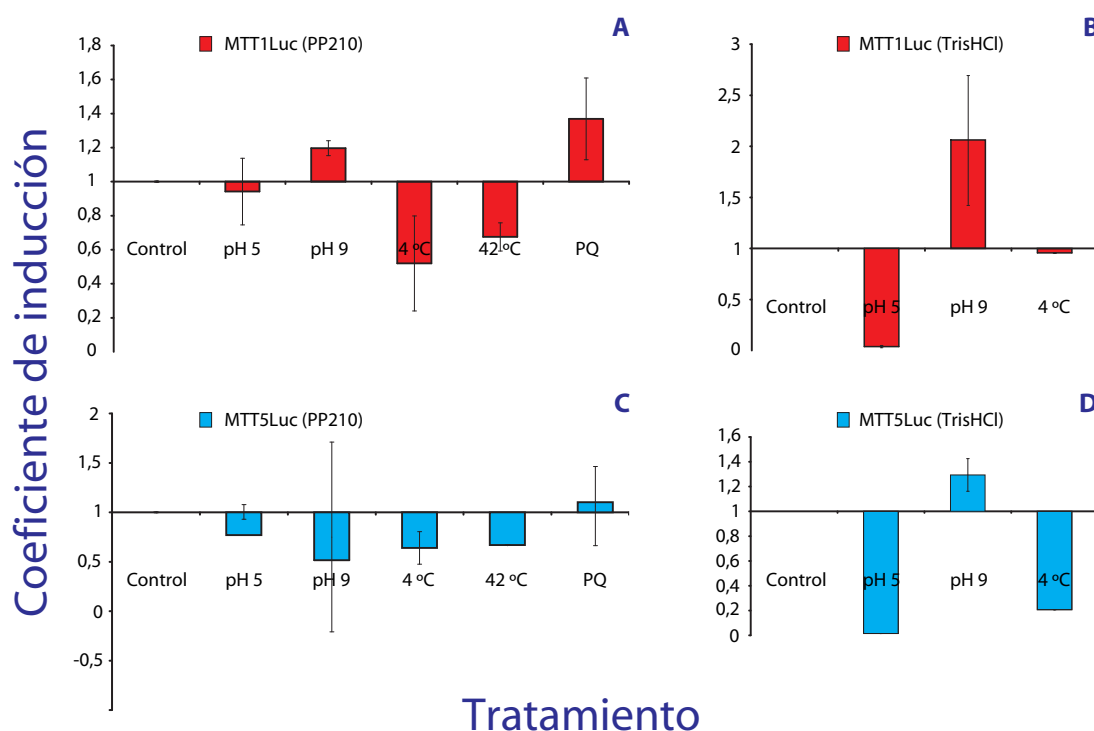


Figura 62. Respuesta de los biosensores MTT1Luc (barras rojas) y MTT5Luc (barras azules) a otros agentes de estrés celular, tras 2 horas de exposición en medio PP210 (**A y C**) o en tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8 (**B y D**). El coeficiente de inducción fue calculado como el cociente entre la luz emitida por las células sometidas al estrés y las que no lo fueron (apartado 14.1 de MYM). Los datos representados corresponden al promedio de dos experimentos independientes.

pesados (Figura 62). Las condiciones de estrés analizadas fueron: un choque térmico de alta (42 °C) o baja (4 °C) temperatura, cambio de pH ácido (pH 5) o básico (pH 9), y exposición al herbicida paraquat (PQ) que origina estrés oxidativo. Para comprobar si la composición del medio influía sobre la respuesta de los biosensores a estas condiciones de estrés, los tratamientos (de 2h) se realizaron en medio PP210 (Figura 62, A y C) o en tampón Tris-HCl (Figura 62, B y D). No se detectaron diferencias significativas en la señal de bioluminiscencia respecto a los niveles basales para ninguno de las condiciones estrés analizadas, independientemente de si la exposición al estrés se llevaba a cabo en medio de crecimiento (PP120) o tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8.

C.2.2.2.5 Análisis de la expresión de las construcciones $P_{MTT1}::lucFF$ y $P_{MTT5}::lucFF$ mediante RT-PCR cuantitativa

C.2.2.2.5.1 Análisis de la expresión del gen reportero *lucFF* en las cepas MTT1Luc y MTT5Luc

Para corroborar que los cambios en los niveles de bioluminiscencia de los biosensores se corresponden con cambios en los niveles de transcripción del gen reportero *lucFF*, mediante RT-PCR cuantitativa se evaluaron los niveles de transcripción del gen *lucFF*, el cual está regu-

lado por los promotores de los genes *TheMTT1* (P_{MTT1}) o *TheMTT5* (P_{MTT5}), en condiciones de estrés originado por metales. Los ensayos de RT-PCR cuantitativa se realizaron en las mismas condiciones que los ensayos de bioluminiscencia, 2 horas de tratamiento a las mismas concentraciones de metales pesados. Además, puesto que los niveles de expresión relativa de *lucFF*, fueron normalizados respecto a la expresión del gen constitutivo *ATU1* (α -tubulina), este experimento permitió comparar el grado de activación de los dos promotores P_{MTT1} y P_{MTT5} entre sí.

Los resultados obtenidos (Figura 63) se correspondían con aquellos obtenidos en los ensayos de bioluminiscencia (Figura 59). El P_{MTT1} era activado principalmente por Cd, mientras que el P_{MTT5} lo era por Cd y Pb, siendo la activación por Cd aproximadamente el doble que la realizada por Pb (Figura 63). A esta concentración (5×10^{-7} M) los metales esenciales Cu y Zn no inducían significativamente la activación de los promotores P_{MTT1} y P_{MTT5} , aunque se detectaba una leve inducción (~ 2 veces) de *lucFF* bajo control de P_{MTT5} por Cu estadísticamente significativa respecto del control (Figura 63). Por lo tanto, como se esperaba, los niveles de activación del P_{MTT5} por metales pesados (fundamentalmente el Cd y el Pb) fueron considerablemente superiores a los del P_{MTT1} , indicando que P_{MTT5} es un promotor más “fuerte” que P_{MTT1} , como ha sido igualmente observado en varios experimentos a lo largo de este trabajo (apartados A.4.1 y C.2.2.2.1 de R).

C.2.2.2.5.2 Análisis de los niveles de expresión de los genes *TtheMTT1* y *TtheMTT5* en las cepas SB1969, MTT1Luc y MTT5Luc

Con el fin de dilucidar si la presencia de las construcciones reporteras $P_{MTT1}::lucFF$ o $P_{MTT5}::lucFF$ (integradas en el locus *btu1-1* de las cepas MTT1Luc o MTT5Luc respectivamente) alteraba la expresión de los genes macronucleares *TtheMTT1* o *TtheMTT5* en las ce-

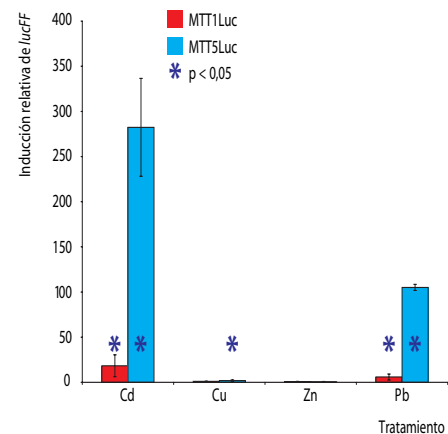


Figura 63. Niveles de expresión del gen reportero *lucFF* en las cepas recombinantes MTT1Luc (barras rojas) y MTT5Luc (barras azules) tras la exposición de las células (2 horas) a distintos metales pesados (5×10^{-7} M) en tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8. Las barras representan el nivel de expresión relativa respecto al cultivo control no tratado (valor 1), y normalizados respecto a la expresión del gen constitutivo α -tubulina (*ATU1*). Cada barra corresponde al valor medio \pm la desviación estándar de dos experimentos independientes. Los asteriscos azules indican diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al control no tratado.

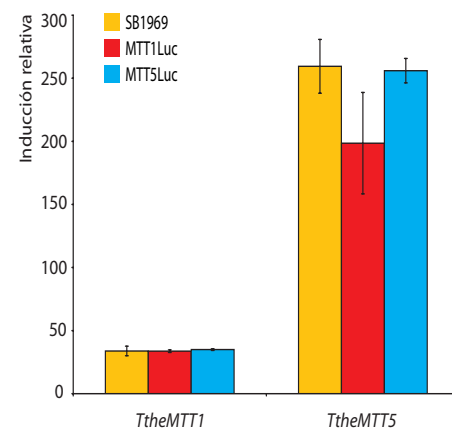


Figura 64. Niveles de expresión de los genes *TtheMTT1* y *TtheMTT5* en las cepas SB1969 (barras naranjas), MTT1Luc (barras rojas) y MTT5Luc (barras azules), tras la exposición de las células (2 horas) a Cd (5×10^{-7} M) en tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8. Las barras representan el nivel de expresión relativa respecto al cultivo control no tratado (valor 1), y normalizados respecto a la expresión del gen constitutivo α -tubulina (*ATU1*). Cada barra corresponde al valor medio \pm la desviación estándar de dos experimentos independientes. No se observaron diferencias significativas en la expresión entre las tres cepas utilizadas.

pas recombinantes, se analizó la expresión de estos dos genes en las cepas SB1969 (salvaje), MTT1Luc y MTT5Luc, mediante RT-PCR cuantitativa tras 2 horas de exposición a una concentración subletal (5×10^{-7} M) de Cd (Figura 64).

Las tres cepas presentaron patrones similares de inducción para cada uno de los dos genes. En las tres cepas la inducción de la expresión de *TtheMTT1* y *TtheMTT5* por Cd era de aproximadamente 33 y 260 veces los niveles basales respectivamente (Figura 64). Aunque en la cepa MTT1Luc la inducción de la expresión de *TtheMTT5* por Cd fue algo menor (~199 veces), la diferencia respecto a la inducción en las otras dos cepas (SB1969 y MTT5Luc) no es estadísticamente significativa.

C.2.3 Validación de los biosensores MTT1Luc y MTT5Luc

C.2.3.1 Muestras naturales contaminadas artificialmente por Cd

El proceso de validación de un biosensor no consiste solamente en la utilización de muestras naturales tomadas de diferentes ecosistemas contaminados o no, sino también en la utilización de muestras naturales (habitualmente de composición compleja) que hayan sido contaminadas artificialmente en el laboratorio. Por ello se realizaron dos tipos de experimentos diferentes con la cepa biosensora MTT5Luc (que es la que presentó mayor sensibilidad de detección y mayores niveles de inducción de la expresión de luciferasa), en los que se utilizaron muestras naturales de agua o tierra que fueron contaminadas o no (control) con Cd en el laboratorio. Además se realizaron ensayos de tipo *ciego*, con el fin de comprobar que los resultados obtenidos no estaban influenciados a priori por las expectativas del investigador (doctorando). En todos estos experimentos, antes de la adición del Cd, se comprobó que las muestras naturales no eran tóxicas para *T. thermophila*. Después de contaminar las muestras con una solución de Cd (a la misma o diferentes concentraciones) ó Cd + EDTA (control de Cd quelado), el biosensor fue expuesto a las diferentes muestras en tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8 durante 2 horas (Tabla 21), y posteriormente se cuantificó la actividad luciferasa *in vitro* (apartado 14 de MYM). Como luminiscencia basal, y al igual que en experimentos previos, se consideró la cantidad de luz emitida por las células incubadas en tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8.

*Experimento 1: detección de Cd biodisponible en agua procedente de una charca artificial con abundante presencia de protistas, microinvertebrados y peces

Las células expuestas durante 2 horas a la muestra de agua sin contaminar, presentaron unos niveles de luminiscencia semejante a los niveles basales (Figura 65), por lo que cabría suponer que esta muestra de agua no presentaba metales en forma biodisponible. En cambio, aquellas alícuotas de la muestra a las que se les había añadido previamente Cd, incrementaron la bioluminiscencia del biosensor considerablemente (Figura 65), siendo el incremento pro-

porcional al aumento de la concentración de Cd. Por el contrario, cuando el biosensor fue expuesto a aquellas muestras de agua a las que se les había añadido Cd quelado por EDTA (Figura 65), la señal de bioluminiscencia se redujo un 86% (muestra con Cd $1,5 \times 10^{-6}$ M + EDTA $10 \mu\text{M}$), o incluso un 100%, siendo similar a los niveles basales (muestras con Cd $2,5$ ó 5×10^{-7} M + EDTA $10 \mu\text{M}$). Probablemente en la muestra con mayor concentración de Cd ($1,5 \times 10^{-6}$ M) la cantidad de EDTA ($10 \mu\text{M}$) no fue suficiente para quelar todo el metal (como en las anteriores de menor concentración de Cd), de ahí la existencia de cierto nivel de bioluminiscencia, similar al originado por la menor concentración de Cd utilizada ($2,5 \times 10^{-7}$ M) (Figura 65).

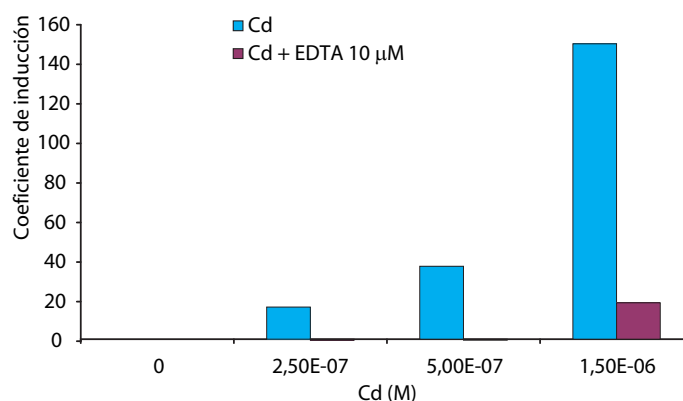


Figura 65. Respuesta del biosensor MTT5Luc al Cd añadido artificialmente a una muestra natural de agua procedente de una charca artificial con numerosas especies de protistas, microinvertebrados y peces. La muestra de agua natural sin contaminar artificialmente (0 de Cd o control) no presentaba metales pesados detectables por el biosensor (luminiscencia emitida igual a la basal). El biosensor fue expuesto, durante 2 horas, a muestras del mismo tipo de agua contaminadas artificialmente con distintas concentraciones de Cd en forma biodisponible o quelado (soluciones de Cd incubadas previamente con EDTA $10 \mu\text{M}$, durante 4 horas), y se determinó la actividad luciferasa *in vitro*, como se describe en el apartado 14.1 de MYM. El coeficiente de inducción fue calculado como el cociente entre la luz emitida por las células expuestas a la muestra de agua (contaminada o no) y la luz emitida por el control (células incubadas en tampón Tris-HCl $0,01$ M pH $6,8$).

*Experimento 2: Ensayos “ciegos” en muestras de suelo y agua

Para evaluar la fiabilidad y credibilidad de los bioensayos realizados con los biosensores en muestras naturales, se realizaron distintos ensayos de tipo “ciego”, en los que la persona (doctorando) que realizaba el experimento no conocía qué muestras habían sido contaminadas previamente con el metal. Para ello se eligieron muestras naturales, de suelo y agua, que dieron negativo (bioluminiscencia basal) en una testación previa con el mismo biosensor, y por lo tanto no contaminadas con metales. Estas muestras fueron contaminadas con Cd ($0,5$ mM) en el laboratorio (Tabla 21). En el 100% de los ensayos realizados, el aumento de la luminiscencia procedente del biosensor (MTT5Luc) tras su exposición a las muestras durante 2 horas, coincidía exclusivamente con aquellas muestras que habían sido contaminadas artificialmente con Cd (Figura 66). Por el contrario, las muestras no contaminadas artificialmente con Cd presentaban unos niveles de bioluminiscencia semejantes a los basales (Figura 66). Los niveles de luminiscencia obtenidos en las muestras de tierra artificialmente contaminadas (Figura 66, A) mostraron valores menores que aquellas procedentes de muestras acuosas (Figura 66, B), lo cual probablemente es debido a la materia orgánica presente en las muestras de tierra (por lo general más abundante que en las muestras de agua), que hacía que parte del Cd añadido estuviera quelado por la misma, y por lo tanto no biodisponible y no tóxico.

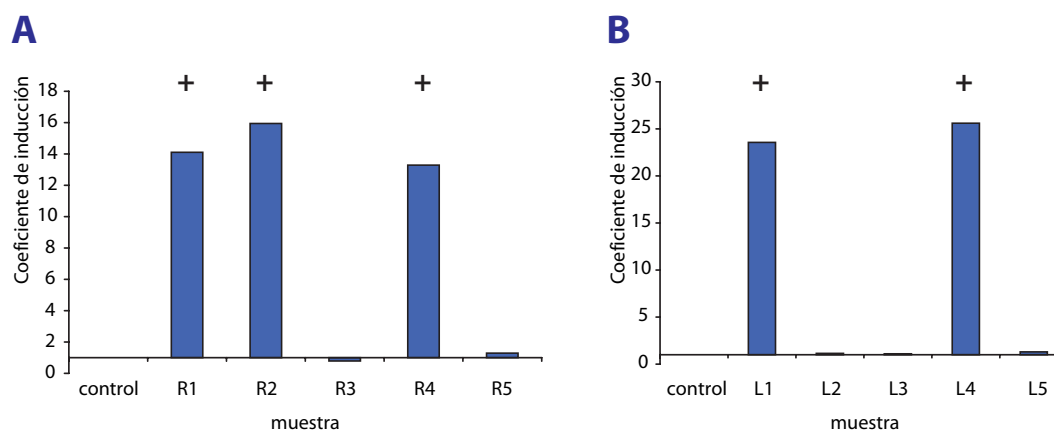


Figura 66. Ensayos “ciegos” sobre la respuesta del biosensor MTT5Luc a la presencia de Cd en muestras naturales contaminadas artificialmente en el laboratorio. **(A):** Muestras R1-R5: alícuotas de una suspensión acuosa de 1 g de tierra (procedente del Parque del Retiro (Madrid)) en 10 ml de H₂O MilliQ. **(B):** Muestras L1-L5: agua procedente de una laguna de la reserva ornitológica Los Charcones (Miguel Esteban, Toledo). Las cruces (+) indican las muestras a las que se les había añadido Cd (0,5 mM).

C.2.3.2 Muestras naturales (con metales pesados de concentración conocida, desconocida o presumiblemente no contaminadas)

Las muestras naturales utilizadas para la evaluación de la presencia de metales usando el biosensor MTT5Luc (Figura 67) o ambos (Figura 68), presentaban una composición en metales conocida (Figura 67) o desconocida (en el caso de que la presentaran) (Figura 68). Las muestras que se indican en la Figura 67, fueron diluidas (10^{-1}) antes de exponerlas al biosensor MTT5Luc, a excepción de la muestra 8 (tierra recogida cerca de una fumarola azufrada en el Parque Natural *Wai-O-Tapu*, Nueva Zelanda), que debido a su toxicidad fue diluida por un factor de 10^{-3} (apartado 14 de MYM).

Tres de las muestras analizadas (muestras 1:Lago Ontario, 2:Parque del Retiro y 7:Parque Nacional *Waipoua Forest*, en Figura 67, A) no indujeron significativamente la bioluminiscencia del biosensor MTT5Luc por lo que cabe pensar que no presentasen metales pesados en forma biodisponible (al menos en concentraciones superiores a nM). Por el contrario, la bioluminiscencia del biosensor aumentó considerablemente cuando fue expuesto a las muestras de suelo de Ámsterdam (3), Estocolmo (4), Aznalcóllar (5 y 6) y *Wai-O-Tapu* (8) (Figura 67, A). El valor más elevado obtenido (después de considerar el factor de dilución aplicado, 10^{-3} para la muestra 8, y 10^{-1} para el resto de muestras) es el de la muestra de suelo 8, recogida en las proximidades de una fumarola volcánica en el Parque *Wai-O-Tapu*.

Los dos biosensores (MTT1Luc y MTT5Luc) fueron también expuestos a muestras de diverso origen pero de composición metálica conocida (muestras 11-18, Figura 68), determinada por las metodologías analíticas convencionales que establece la legislación ambiental. Como se observa en la Figura 68 A, el biosensor MTT1Luc sólo detectó la presencia de metales pesados en las muestras de suelo 14, 17 y 18, mientras que la cepa MTT5Luc fue capaz de detectar la presencia de metales en todas las muestras empleadas, corroborando una vez más la mayor sensibilidad de esta cepa. Las muestras que produjeron un mayor aumento en los nive-

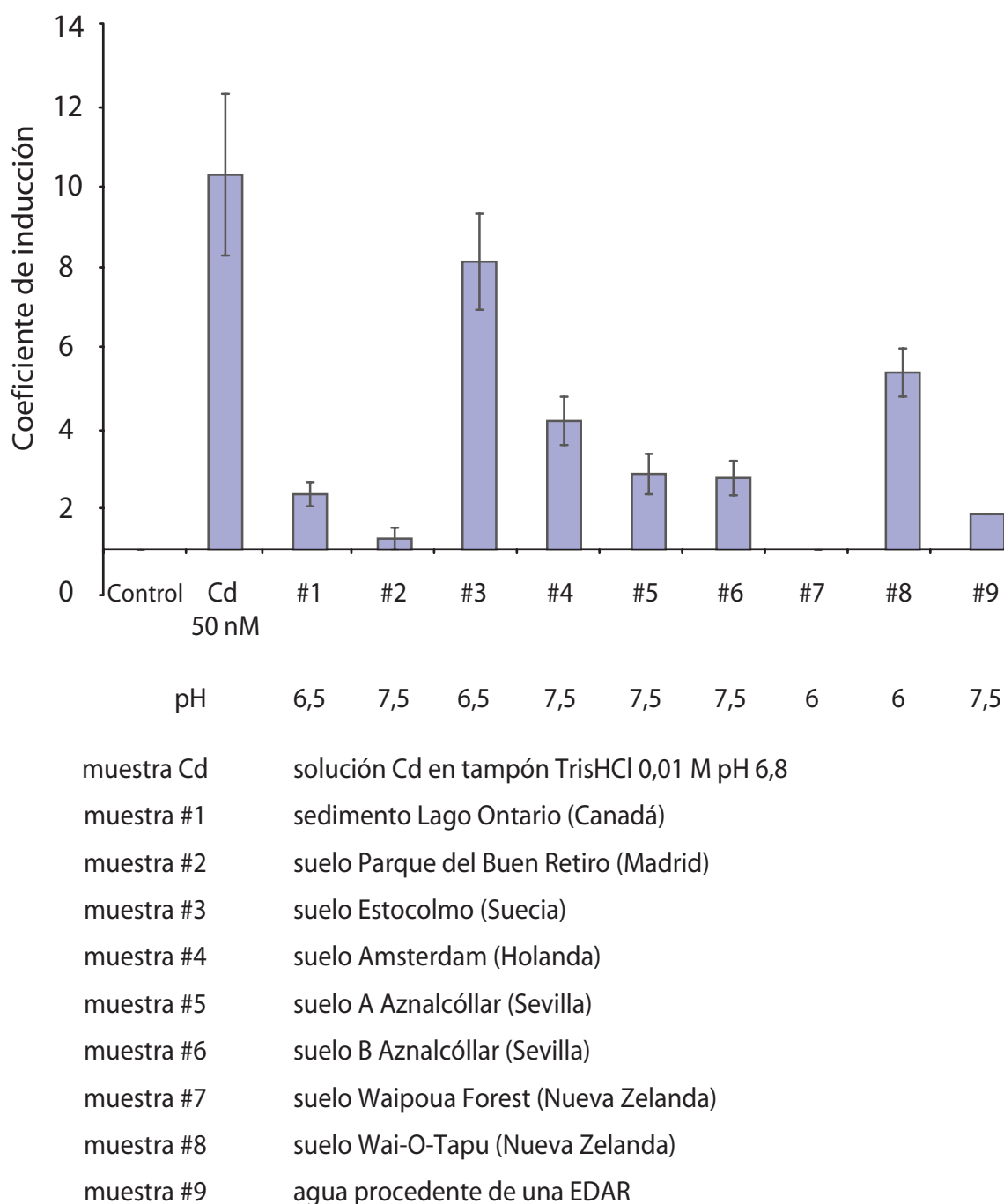
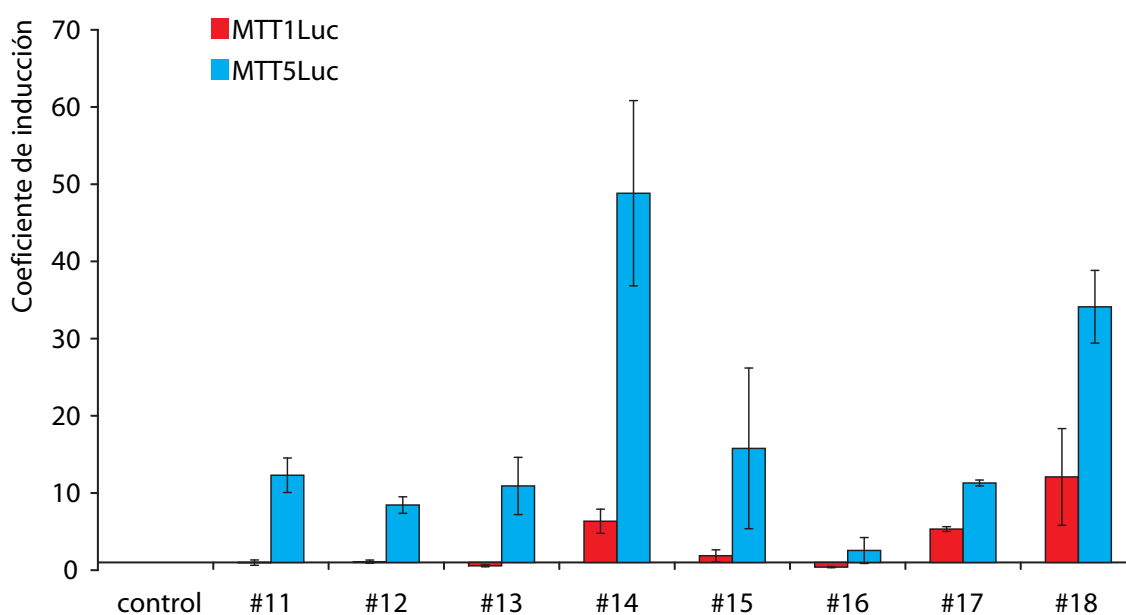


Figura 67. Respuesta del biosensor MTT5Luc a varias muestras de suelo de distinta procedencia geográfica. El histograma muestra los niveles de inducción de la expresión de luciferasa del biosensor tras la exposición durante 2 horas a la muestra (extracto acuoso y filtrado de 1g de muestra / 10 ml de H₂O milliQ), a una dilución de 10⁻¹ ó 10⁻³ (para la muestra 8). La bioluminiscencia basal se establece como aquella que poseen las células incubadas en tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8 (control). Como control positivo (+) se incubaron las células en tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8 conteniendo Cd 50 nM. El coeficiente de inducción fue calculado como el cociente entre la luz emitida por las células expuestas y las no expuestas al metal (control) como se describe en el apartado 14.1 de MYM.

les de bioluminiscencia en ambos biosensores fueron las muestras 14 y 18, correspondientes a un lodo procedente de una EDAR empleado con fines agrícolas, y una muestra de suelo del oeste de la Península Ibérica, respectivamente. Por el contrario, la muestra 6 (sedimento de una laguna de Madrid) produjo el menor incremento en la expresión de luciferasa en MTT5Luc, por lo que sería la muestra con menor cantidad de metales en forma biodisponible.

A**B**

contenido total en metales	Cd (µg/kg)	45,32	36,9	42,56	370	34	?	3,05	5,21
	Cr (mg/kg)	7,17	7,15	7,61	27,12	6,48	?	?	?
	Cu (mg/kg)	5,67	5,98	6,57	205,3	3,43	?	?	?
	Ni (mg/kg)	3,44	4,73	5,59	147,2	5,25	?	?	?
	Pb (mg/kg)	7,26	7,05	10,07	29,03	5,21	12,57	?	?
	Zn (mg/kg)	21,08	21,05	26,65	429,7	22,47	?	?	?
	Hg (µg/kg)	56,61	49,46	49,3	773,5	49,52	?	?	?
	pH	6	6,5	7	7,5	7	6,5	5	5

muestra#11	suelo regado con efluente EDAR
muestra#12	suelo tratado con gallinaza
muestra#13	suelo tratado con compost de RSU
muestra#14	lodo EDAR con fines agrícolas
muestra#15	suelo agrícola oeste de Madrid
muestra#16	sedimento laguna provincia de Madrid
muestra#17	suelo oeste Península Ibérica 1
muestra#18	suelo oeste Península Ibérica 2

Figura 68. Respuesta de los biosensores MTT1Luc y MTT5Luc a diferentes muestras de suelo con contaminación conocida de metales. **(A):** Histograma mostrando los valores de coeficiente de inducción de ambos biosensores tras 2 horas de exposición a la muestra (extracto acuoso y filtrado de 1g de muestra / 10 ml de H₂O milliQ). **(B):** Características de las muestras: contenido total de metales detectados en cada muestra, determinado por métodos físico-químicos. ?: No analizado. El coeficiente de inducción fue calculado como el cociente entre la luz emitida por las células expuestas y las no expuestas al metal (control) como se describe en el apartado 14.1 de MYM. Los datos corresponden al valor medio de 3 experimentos independientes. RSU: Residuos Sólidos Urbanos. EDAR: Estación Depuradora de Aguas Residuales.

Discusión

A. LA FAMILIA DE METALOTIONEÍNAS EN *Tetrahymena*

A.1 Genes de metalotioneínas en *Tetrahymena*: mayor longitud y ausencia de intrones respecto a otros genes de metalotioneínas

En general los genes de metalotioneínas (MTs) están localizados en el mismo cromosoma o en la misma región cromosómica, lo que podría reflejar que el origen de estos genes pudiera deberse a fenómenos de duplicación génica. En humanos, las 4 isoformas básicas (MT-1 (con 11 copias) MT-2, MT-3 y MT-4) están agrupadas en el cromosoma 16 (Coyle *et al.* 2002). En ratón hay 4 genes (MT-1 a MT-4) dentro de una región de 60 Kb en el cromosoma 8 (Davis y Cousins 2000), aunque se ha descrito un gen semejante a MT (MTL-5) en el cromosoma 19 B (Haq *et al.* 2003). Sin embargo, en *T. thermophila* (la única especie del género *Tetrahymena* en la que los genes MT han sido localizados en cromosomas), los 5 genes MT se distribuyen en tres cromosomas diferentes. *TtheMTT1* y *TtheMTT3* están localizados uno a continuación de otro (separados por 1,7 kb) en el brazo derecho del cromosoma 4 (Díaz *et al.* 2007), *TtheMTT5* en el cromosoma telocéntrico 5 (Díaz *et al.* 2007), y finalmente *TheMTT2* y *TtheMTT4* en el brazo derecho del cromosoma 2 (Bakshandeh *et al.* 2004).

Hasta hoy se han identificado once genes MT en distintas especies del género *Tetrahymena* (Piccinni *et al.* 1999; Boldrin *et al.* 2002; Shang *et al.* 2002; Bakshandeh *et al.* 2004; Boldrin *et al.* 2006; Fu y Miao 2006; Díaz *et al.* 2007; Shuja y Shakoori 2007; Amaro *et al.* 2008; Guo *et al.* 2008). La mayoría de ellos han sido aislados como moléculas de ADNc (Tabla A1, Anexo). A partir del alineamiento de estos ADNc con su correspondiente secuencia de ADN genómico, se ha comprobado la ausencia de intrones en la secuencia codificante de todos estos genes MT. Tampoco contiene intrones el gen codificante para una hipotética Cd-MT identificada en el ciliado *Paramecium* sp. descrito recientemente (Shuja y Shakoori 2008). Esta secuencia no ha

sido incluida en el análisis comparativo llevado a cabo con las secuencias MT de las diferentes especies de *Tetrahymena*, ya que aún no ha sido analizada la inducción de su expresión por metales pesados.

En general, lo más común es que los genes MT contengan intrones (Hamer 1986; Leignel *et al.* 2008). Los genes MT de vertebrados presentan una estructura de 3 exones y 2 intrones, mientras que en invertebrados hay una mayor heterogeneidad en el número de intrones (Samson y Gedamu 1998). Aunque no son muy frecuentes, se han descrito genes MT sin intrones en algunos bivalvos marinos, en los que se ha propuesto que la ausencia de intrones represente una adaptación genética para permitir una transcripción más rápida en respuesta a la presencia de metales (Leignel *et al.* 2005). En otros organismos modelo (*A. thaliana*, *S. cerevisiae*, *S. pombe* y *M. musculus*) se ha observado que aquellos genes cuya expresión se modifica rápidamente en respuesta a estrés, contienen un bajo número de intrones. Se ha propuesto que los intrones en estos genes podrían retrasar la respuesta celular al estrés, ya que los intrones tendrían que ser transcritos y eliminados, suponiendo además un mayor gasto energético y tiempo invertido (Jeffares *et al.* 2008). Este razonamiento, por el contrario, estaría en contraposición con el hecho de que la mayoría de los genes MT presentan intrones, y su expresión es suficientemente rápida (1-2 h) (Miles *et al.* 2000) para contrarestar el estrés originado por el metal.

Además de la ausencia de intrones, los genes MT de *Tetrahymena* se diferencian del resto de genes MT por su mayor longitud (237-543 pb frente a 75-261 pb en otros organismos, datos inferidos de los rangos de longitudes de las proteínas MT mostrados en la Tabla 30) y por el alto grado de similitud interna de la secuencia nucleotídica (Boldrin *et al.* 2003; Fu y Miao 2006; Díaz *et al.* 2007). Parece por tanto, que dada la gran longitud de los genes MT de *Tetrahymena* (237-543 pb), la ausencia de intrones en los mismos podría representar una adaptación génica para contribuir a una mayor rapidez de la respuesta celular al estrés.

A.2 Las MTs de *Tetrahymena* se agrupan en dos subfamilias distintas: 7a (Cd-MTs) y 7b (Cu-MTs)

Las metalotioneínas de ciliados se han asignado a la familia 7, según la última clasificación propuesta para la superfamilia de MTs (Binz y Kägi 1999), y esta inclusión se hizo en base a las características de la estructura primaria de la proteína TpyrMT-1 (Piccinni *et al.* 1994), la única MT de ciliados descrita en el momento de hacer esta clasificación. Desde entonces y hasta la actualidad se han identificado once MTs en ciliados, todas ellas dentro del género *Tetrahymena*, incluyendo las tres descritas en este trabajo. Recientemente se ha descrito la hipotética MT de *Paramecium* sp. (Shuja y Shakoori 2008), que presenta unas secuencias nucleotídica y aminoacídica que difieren tanto de las MTs de otros organismos como de las Cd-MTs y Cu-MTs de *Tetrahymena*. Como se ha indicado antes, esta hipotética MT de *Paramecium* sp. no se ha incluido en nuestro análisis comparativo por las razones anteriormente aludidas.

Subfamilia	Cys en motivos CC o CCC	Motivos que componen los módulos (secuencias consenso)	Disposición de Lys entre dos Cys ¹	Preferencia de inducción de la expresión por Cd o Cu ²
7a (Cd-MTs)	Todas	C ₂ X ₆ (el más común) y CKCX ₂ CXC ₂ K	Minoría	Cd > Cu
7b (Cu-MTs)	Básicamente ninguna	No presenta estructura modular clara. Repeticiones del motivo CKCX ₂₋₃ CKC	Mayoría	Cu > Cd

Tabla 29. Principales características diferenciales de las subfamilias 7a y 7b de MTs del género *Tetrahymena*. C: Cys, K: Lys, X: cualquier aminoácido. ¹La localización de los residuos de Lys y Cys se pueden comprobar en los alineamientos de las Figuras 16 y 20. ²La expresión por Cd o Cu de cada gen MT ha sido analizada por distintos autores: *TtheMTT1* (Dondero *et al.* 2004) (apartado A.4.1 de R, Díaz *et al.* 2007; Santovito *et al.* 2007), *TtheMTT3* (apartado A.4.1 de R, Díaz *et al.* 2007), *TtheMTT5* (apartado A.4.1 de R, Díaz *et al.* 2007), *TpigMT-1* (Guo *et al.* 2008), *TpyrMT-1* y *TpyrMT-2* (Fu y Miao 2006), *TrosMTT1* y *TrosMTT2* (apartado A.4.2 de R, Amaro *et al.* 2008).

De acuerdo con los diferentes resultados obtenidos del análisis de las diferentes MTs del género *Tetrahymena*, como el análisis filogenético, la organización de los residuos de Cys en diferentes motivos, la localización de los residuos de Lys respecto a las Cys, y sus mayores niveles de inducción por Cd o Cu, se ha dividido a la familia 7 de MTs de *Tetrahymena* en dos subfamilias distintas: 7a y 7b (apartado A.3 de R). Esta clasificación ha sido inicialmente establecida y publicada (Díaz *et al.* 2007) por nuestro grupo en base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, e igualmente ha sido aceptada por la comunidad científica internacional (Díaz *et al.* 2007; Guo *et al.* 2008).

Las distintas isoformas de MTs descritas en diversos organismos muestran una diferente capacidad/preferencia para unir Cd²⁺/Zn²⁺ o Cu⁺ (Valls *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2001; Tio *et al.* 2004; Egli *et al.* 2006; Villarreal *et al.* 2006). Las MTs de la subfamilia 7a unen eficazmente Cd (Piccinni *et al.* 1994; Dondero *et al.* 2004) y su expresión se induce preferentemente por este metal (Tablas 29 y 33). Por el contrario, las MTs de la subfamilia 7b unen eficazmente Cu (Santovito *et al.* 2001), y este metal esencial es el mejor inductor de su síntesis (Tablas 29 y 33). Por estas razones, entre otras, se considera que la subfamilia 7a está formada por Cd-MTs y la subfamilia 7b por Cu-MTs. Las características diferenciales de cada subfamilia se resumen en la Tabla 29.

La subfamilia 7a está compuesta por 7 Cd-MTs: la MT-1 de *T. pigmentosa* (TpigMT-1); las MT-1 y MT-2 de *T. pyriformis* (TpyrMT-1 y TpyrMT-2); las MTT1, MTT3 y MTT5 de *T. thermophila* (TtheMTT1, TtheMTT3 y TtheMTT5); la MTT1 de *T. tropicalis* (TtroMTT1); y la MTT1 de *T. rostrata* (TrosMTT1) (Piccinni *et al.* 1999; Shang *et al.* 2002; Dondero *et al.* 2004; Fu y Miao 2006; Díaz *et al.* 2007; Shuja y Shakoori 2007; Amaro *et al.* 2008). La subfamilia 7b está compuesta por cuatro Cu-MTs: la MT-2 de *T. pigmentosa* (TpigMT-2), las MTT2 y MTT4 de *T. thermophila* (TtheMTT2 y TtheMTT4), y la MTT2 de *T. rostrata* (TrosMTT2) (Boldrin *et al.* 2002; Díaz *et al.* 2007; Amaro *et al.* 2008; Boldrin *et al.* 2008). Según el análisis filogenético realizado por tres metodologías de inferencia filogenética distintas (NJ, ML y MB) (apartado A.3 de R), la separación de estos dos grupos es clara. La probabilidad de que esta separación sea correcta es de un 99,9 % y 100 %, según los árboles inferidos mediante los métodos de ML y MB respectivamente (Figura 17).

	Familia MT	aa	MM (kDa)	Cys	%Cys	CCC	aa aromáticos ¹	His ²	Lys / Arg	Referencia
1	Vertebrados	60-68	6-7	19-23	32-34	I ³	0	0-1	5-9 / 0-3	(Miles et al. 2000; Trinchella et al. 2008)
2	Moluscos	64-87	7-9	21-26	28-30	I ³	0	0-4	7-14 / 0-2	(Jenny et al. 2006)
3	Crustáceos	58-64	8-8,2	18-21	31-32,7	I ³	0	0	6-9 / 1	(Syring et al. 2000)
4	Equinodermos	64-67	6-7	19-20	29-31	NO	1 F	0	7 / 0	(Nemer et al. 1985)
5	Dípteros	40-43	3,9	10-11	25	NO	0	0	5 / 0	(Maroni et al. 1987; Egli et al. 2006)
6	Nemátodos	62-74	6,6-8	16-20	25-28	NO	1 Y	1-4	8-13 / 0	(Freedman et al. 1993)
7	Ciliados (<i>Tetrahymena</i>)									
	Cd-MTs								Lys > Arg	
	TpyrMT-1	107	11	31	29	SI	0	0	15 / 0	(Fu y Miao 2006)
	TpyrMT-2	181	19,3	54	29,8	SI	0	0	23 / 0	(Fu y Miao 2006)
	ThemMT1	162	16,7	48	29,6	SI	1 F	0	20 / 0	(Diaz et al. 2007)
	ThemMT3	162	17,3	42	25,9	SI	2 Y	2	20 / 1	(Diaz et al. 2007)
	ThemMT5	99	10,5	24	24,2	SI	1 F 1W 2Y	0	13 / 0	(Diaz et al. 2007)
	TroMT1	156	15,9	47	30,1	SI	1 F	0	19 / 0	(Shuja y Shakoori 2007)
	TroMT1	113	11,5	34	30,1	SI	0	0	14 / 0	(Amaro et al. 2008)
	TpigMT-1	118	12,4	34	28,8	SI	1 F	0	17 / 0	(Guo et al. 2008)
	Cu-MTs								Lys > Arg	
	ThemMT2	108	11,1	32	29,6	NO	0	1	11 / 0	(Boldrin et al. 2008)
	ThemMT4	108	11,2	32	29,6	NO	0	1	12 / 0	(Bakshandeh et al. 2004)
	TpigMT-2	96	10	28	29,2	NO	0	0	11 / 0	(Boldrin et al. 2002)
	TroMTT2	78	8,2	22	28,2	NO	0	0	11 / 0	(Amaro et al. 2008)
8	Hongos 1	25-27	2,5	7	27	NO	0		1 / 0	(Münster y Lerch 1985; Münster et al. 1987)
9	Hongos 2	63	6,4	18	28,6	NO	0	3	7 / 0	(Mehra et al. 1989)
10	Hongos 3	51	5,3	16	30,8	NO	1 Y	1	3 / 0	(Mehra et al. 1989)
11	Hongos 4	54-55	5,8	9	16-16,6	I ³	1-3 F	1-2	4-8 / 0	YlipMT(P41927, P41928, Q9HFD0, Q9HFC9)
12	Hongos 5	61	6,7	12	19,7	NO	3 F	1	7 / 0	(Winge et al. 1985)
13	Hongos 6	69	7,3	19	27,5	NO	0	2	10 / 0	(Culotta et al. 1994)
14	Bacterias	53-58	6-8	8-10	17-19	NO	SI ⁴	SI	2-5 / 0-3	(Robinson et al. 2001)
15	Plantas Tipo1	45-75	4,6-7	12-13	16-29	NO	SI ⁴	0-1	3-6 / 0-1	(Cobbett y Goldsbrough 2002)
	Plantas Tipo2	77-81	7,6-8	14-17	17-18	NO	SI ⁴	0-1	3-6 / 0-1	
	Plantas Tipo3	60-69	6,4-8	10-12	15-17	NO	SI ⁴	0-1	6-8 / 0	
	Plantas Tipo4	76-81	7,8-8	16-17	19-21	NO	SI ⁴	0-1	1-3 / 2-6	

Tabla 30. Características diferenciales entre las distintas familias de MTs según la clasificación de Binz y Kägi (1999). La clasificación de las MTs de plantas ha sido sustituida por la propuesta por Cobbett y Goldsbrough (2002). F: Phe, W: Trp, Y: Tyr, C: Cys, MM: masa molecular. ¹ Y ² se indica el número de aminoácidos aromáticos (Phe, Trp, Tyr) o His que presentan algunas de las isoformas pertenecientes a cada familia. ³ se ha descrito una isoforma en la familia que contiene un motivo CCC en su secuencia aminoacídica. ⁴ contienen varios aminoácidos aromáticos en su secuencia.

A.3 Análisis comparativo de la estructura primaria de las MTs de *Tetrahymena*

Las MTs de *Tetrahymena* presentan diferencias significativas con MTs de otros organismos, por ejemplo con las MTs de vertebrados que podríamos llamar MTs clásicas. Las principales características diferenciales se muestran en la Tabla 30. Son proteínas más largas y de mayor masa molecular (78-181 aa; 8,2-19,3 kDa) que las MTs del resto de organismos (25-87 aa; 2,5-9 kDa). Sin embargo, a pesar de su mayor longitud, el contenido medio en residuos de Cys que presentan se encuentra dentro del porcentaje medio de Cys del resto de MTs (15-34 %) (Tabla 30). El pI (punto isoeléctrico) inferido de sus secuencias aminoacídicas (7,2 – 8,4) es similar al que presentan las MTs de otros organismos (7-8,5), dentro del rango de la neutralidad o ligeramente básico. Son proteínas estables con una vida media estimada (igualmente inferida de su secuencia aminoacídica) de 30 h. El perfil de hidropaticidad estimada para las MTs de *Tetrahymena* es de -0,54 (para las Cd-MTs) y -0,44 (para las Cu-MTs), indicando un más elevado carácter hidrofílico que las MTs de vertebrados (-0,15 como promedio) (Trinchella *et al.* 2008).

En general se ha descrito que las MTs clásicas (MTs de vertebrados) no contienen aminoácidos aromáticos en su secuencia (Coyle *et al.* 2002), como sucede en todas las Cu-MTs y algunas Cd-MTs de *Tetrahymena* (Tabla 30). Sin embargo, la mayoría de las Cd-MTs de *Tetrahymena* presentan aminoácidos aromáticos en su secuencia (Phe>Tyr>Trp) (Tabla 30). Igualmente, la presencia de aminoácidos aromáticos es frecuente en las MTs de plantas, bacterias y levaduras, y, aunque en menor frecuencia, también en algunas especies de hongos filamentosos e invertebrados (Tabla 30).

En general la His es un residuo poco frecuente en la secuencia aminoacídica de las MTs (Coyle *et al.* 2002). Solamente tres de las once MTs de *Tetrahymena* lo presentan (Tabla 30). Además se creía que las MTs coordinaban los iones metálicos exclusivamente a través de los aniones tiolato de los residuos de Cys (Vasak y Hasler 2000). Sin embargo, en la última década se han identificado nuevas MTs de diversos organismos (bacterias, hongos, plantas y animales) que contienen residuos de His (1-4) (Tabla 30). Estudios recientes han demostrado que estas His participan en la unión con los metales, que estabilizan los motivos de Cys disminuyendo la carga global, que pueden disminuir la probabilidad de que se formen puentes disulfuro, y que además incrementan la afinidad de estas MTs por Zn en comparación con el Cd (Blindauer 2008). Como refleja la Tabla 30, en *Tetrahymena* sólo una Cd-MT (TtheMTT3) (con 2 His) y dos Cu-MTs (TtheMTT2 y TtheMTT4) (con sólo una His) contienen residuos de His en su secuencia, aunque desconocemos si influyen en la capacidad de estas MTs en su unión con Zn.

La secuencia aminoacídica de las MTs de *Tetrahymena* presenta una elevada asimetría en la utilización de los aminoácidos básicos Lys/Arg (Lys>>Arg). Las distintas isoformas de *Tetrahymena* presentan un elevado número de Lys (K) (11-12 K las Cu-MTs y 13-23 K las Cd-MTs), y en cambio, ningún residuo de Arg (R). Solamente una isoforma de Cd-MT (TtheMTT3) contiene un residuo de Arg en su secuencia (Tabla 30). La preferencia de usar principal o exclusivamente el aminoácido Lys en lugar de Arg parece ser un hecho general en las MTs (Tabla 30), excepto

en algunos casos, como la Zn-MT de clase II de *Zea mays* (Nº Acc. P43401) (con 2K/6R) y algunas hipotéticas MTs de procariotas (*Pseudomonas entomophila* (Nº Acc. YP_608349) (3K/3R), o *Nitrosococcus oceanii* (Nº Acc. YP_344861) (3K/2R).

A.4 Distribución de los residuos de Cys: Las Cd-MTs de *Tetrahymena* presentan motivos CCC típicos

Desde un punto de vista funcional, las Cys son los principales residuos que componen las MTs, y que además les confieren la capacidad de unir metales a través de la formación de complejos metal-tiolato (Coyle *et al.* 2002). Aunque el contenido en Cys de las MTs de *Tetrahymena* se encuentra dentro del porcentaje medio de Cys del resto de MTs, dada su mayor longitud, las MTs de *Tetrahymena* son las MTs con mayor número de residuos de Cys por molécula (22-54 Cys) de todas las MTs actualmente descritas (9-23 Cys) (Tabla 30). En las MTs de *Tetrahymena* las Cys se disponen no solamente en los motivos típicos de las MTs de otros organismos (CCX, CXC o XXCXX, donde X es cualquier aminoácido), sino también en otros motivos adicionales (CCC, CXCC y CXCXC) que no suelen aparecer (salvo raras excepciones) en el resto de las MTs. Por el contrario, las Cu-MTs de *Tetrahymena* solamente presentan los motivos clásicos como la mayoría de las MTs conocidas (Tabla 31). En la subfamilia 7a (Cd-MTs) la mayoría de las Cys se agrupan en los motivos CCC (31,5 % del total) y CCX (33,7 %), mientras en la subfamilia 7b (Cu-MTs) la mayoría de Cys se disponen en los motivos CXC (89,5 %) (Tabla 31). Las Cd-MTs de *Tetrahymena* son las únicas MTs que presentan motivos CCC y CC en la misma secuencia aminoacídica. Aunque el motivo CCC no es exclusivo de las Cd-MTs de *Tetrahymena*, son muy pocas las MTs que lo presentan: la MT-1B de *H. sapiens* (Nº Acc. P07438), una CdMT del gusano *Eisenia fetida* (Nº Acc. ABC48927), la MT-II de la levadura *Yarrowia lipolytica* (Nº Acc. P41928), una CuMT (MT-II) del artrópodo *Callinectes sapidus* (Nº Acc. AAF08966) y una isoforma del molusco *Crassostrea virginica* (Nº Acc. CAK22381) (Gruber *et al.* 2000; Syring *et al.* 2000; Jenny *et al.* 2006). Por lo tanto, parece que la presencia del motivo CCC no determina *a priori* la preferencia por unir Cd o Cu de una MT, puesto que aunque aparece exclusivamente en las Cd-MTs de *Tetrahymena*, también aparece en Cu-MTs como la del artrópodo *C. sapidus* (Domenech *et al.* 2008), y posiblemente en otras de las anteriormente citadas que pueden unir preferentemente Cu frente a Cd, pero este particular lo desconocemos.

A.5 Capacidad queladora teórica de las MTs de *Tetrahymena*

Actualmente desconocemos cómo influye el motivo CCC en la capacidad queladora de las MTs que lo presentan. La única información publicada respecto a las MTs de *Tetrahymena* es que TpyrMT-1 une 11 (Domenech *et al.* 2008) ó 12 (Piccinni *et al.* 1994) iones Cd^{2+} *in vitro* por molécula. Dondero *et al.* (2004) han estimado que TtheMTT1 une 16 iones de Cd^{2+} . Y por otro lado, la estructura nativa de TpigMT-2 contiene 7 Cu^{+} /molécula (Santovito *et al.* 2001).

Cd-Metalotioneínas (subfamilia 7a)										
Motivo	TpigMT-1	TpyrMT-1	TpyrMT-2	TrosMTT1	TtheMTT1	TtheMTT3	TtheMTT5	TtroMTT1	Total C ¹	%C ¹
CCC	4	4	6	4	6	2	1	6	99	31,5
CXCC	2	2	5	2	3	2	1	3	60	19,1
CXCXC	0	0	0	0	0	1	0	0	3	1
CCX	6	5	6	6	8	9	5	8	106	33,8
CXC	2	1	4	2	2	3	1	2	34	10,8
XXCXX	0	1	1	0	0	3	1	1	12	3,8
Total C ²	34	31	54	34	48	42	24	47	314	
Total aa	118	107	181	113	162	162	99	156		
% C	28,8	29	29,8	30,1	29,6	25,9	24,2	30,1		
Cu-Metalotioneínas (subfamilia 7b)										
Motivo	TpigMT-2	TrosMTT2	TtheMTT2	TtheMTT4	Total C ¹	%C				
CCC	0	0	0	0	0	0				
CXCC	0	0	0	0	0	0				
CXCXC	0	0	0	0	0	0				
CCX	1	1	0	0	4	3,5				
CXC	12	9	15	15	102	89,5				
XXCXX	2	2	2	2	8	7				
Total C ²	28	22	32	32	114					
Total aa	96	78	108	108						
% C ²	29,2	28,2	29,6	29,6						

Tabla 31. Distribución de los residuos de Cys en diferentes motivos en las secuencias aminoácidas de las MTs del género *Tetrahymena*. C: Cys. X: cualquier aminoácido. Total C¹: número total de residuos de Cys que se agrupan en cada tipo de motivo. (teniendo en cuenta todas las Cd-MTs o Cu-MTs). %C¹: porcentaje de Cys que se agrupan en ese motivo respecto del total de residuos de Cys (teniendo en cuenta todas las Cd-MTs o Cu-MTs). Total C²: número total de Cys de cada isoforma de MT. %C²: porcentaje de Cys de cada MT respecto al total de aminoácidos de la proteína. Tpig: *T. pigmentosa*. Tpyr: *T. pyriformis*. Tros: *T. rostrata*. Tthe: *T. thermophila*. Ttro: *T. tropicalis*.

Aunque no tiene que ser necesariamente cierto, se podría pensar que dado el mayor número de residuos de Cys que presentan las MTs de *Tetrahymena*, pudieran ser capaces de quelar un mayor número de iones metálicos que las MTs de vertebrados (7 Cd ó 12 Cu por molécula). En las MTs de vertebrados todas las Cys están implicadas en la quelación de metal (Kägi 1993), siendo la estequiometría $\text{Cd}_7(\text{Cys})_{20}$ para las Cd-MTs, o $\text{Cu}_{12}(\text{Cys})_{20}$ para las Cu-MTs. Asumiendo que esto podría, igualmente, ser aplicable a las MTs de *Tetrahymena*, se ha calculado el número de iones metálicos (Cd o Cu) que estas proteínas podrían unir (Tabla 32). Algunos de los datos experimentales citados en el párrafo anterior corroboran algunos de los datos teóricos. Por ejemplo, para TpyrMT-1 (11 ó 12 Cd^{2+} / molécula) (Domenech *et al.* 2008; Piccinni *et al.* 1994) vs. 11 (dato teórico inferido) o para TtheMTT1 (16 Cd^{2+}) (Dondero *et al.* 2004) vs. 17 (dato teórico inferido) (Tabla 32). Siendo por lo tanto 11, 12 ó 16 valores superiores al de 7 Cd^{2+} estimado para las MTs de vertebrados. No ocurre así para la Cu-MT (TpigMT-2) (7 Cu^+ por molécula) (Santovito *et al.* 2001) respecto a 16 (dato teórico) (Tabla 32).

Tetrahymena Cd-MTs	Átomos de Cd^{2+} /molécula	Tetrahymena Cu-MTs	Átomos de Cu^+ /molécula
TtheMTT1	17	TtheMTT2	19
TtheMTT3	15	TtheMTT4	19
TtheMTT5	8	TpigMT-2	16
TrosMTT1	12	TrosMTT2	13
TpigMT-1	12		
TtroMTT1	16		
TpyrMT-1	11		
TpyrMT-2	19		
Vertebrados MTs	7	Vertebrados MTs	12

Tabla 32. Capacidad queladora teórica de las MTs de *Tetrahymena* respecto a las MTs de vertebrados.

Una de las características estructurales que diferencia a ambas subfamilias de MTs de *Tetrahymena* es la localización en la secuencia aminoacídica de los residuos de Cys y Lys (Figura 16). En Cu-MTs (subfamilia 7b), existe una fuerte tendencia a que los residuos de Lys (K) se sitúen entre residuos de Cys (CKC) (entre 7-10 agrupaciones CKC/molécula) (Figura 20), como igualmente se detecta en MTs de mamíferos, aunque en menor cantidad (2-3 agrupaciones CKC/molécula) (Amaro *et al.* 2008). Por el contrario, en las Cd-MTs (subfamilia 7a) de *Tetrahymena* estas agrupaciones CKC son más escasas, y se concentran en regiones de la molécula que denominamos submódulos tipo 2 (Apartados A.3.2 de R, y A.6 de D). Se ha descrito que los residuos de Cys que tienen adyacente en la secuencia un residuo aminoácido básico (como la Lys) tienen un valor pK considerablemente menor, y en consecuencia decrece la reactividad de dicho residuo de Cys (Parente *et al.* 1985). Por lo tanto, es posible que algunas MTs como las Cu-MTs de *Tetrahymena* puedan tener una capacidad de unión con el ión metálico menor que la que teóricamente se le pueda asignar. Habría que esperar a obtener un mayor número de datos experimentales sobre la capacidad de estas MTs para afirmar, de manera general y con mayor certidumbre, que las MTs de *Tetrahymena* pueden unir un mayor número de iones metálicos. De momento, las 2 Cd-MTs de *Tetrahymena* analizadas (Piccinni *et al.* 1994; Domenech *et al.* 2008) así lo indican.

A. 6 Las MTs de la subfamilia 7a (Cd-MTs) comparten una estructura modular

Anteriormente diversos autores han descrito la similitud interna en algunas de las Cd-MTs de *Tetrahymena* (Boldrin *et al.* 2003; Dondero *et al.* 2004; Fu y Miao 2006). A partir del alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de las Cd-MTs de *Tetrahymena* (subfamilia 7a) (Figura 16) determinamos que las Cd-MTs presentan una estricta estructura modular (Figuras 18 y 19) (Díaz *et al.* 2007). Todas las secuencias aminoacídicas de los 8 miembros de la subfamilia 7a se pueden dividir en segmentos, que inicialmente se definen con el criterio de que cada segmento lleva un motivo CXCK en su extremo carboxilo-terminal (con algunas excepciones) (Figura 18). A estos segmentos los hemos denominado “módulos”, los cuales varían en longitud (27-54 aa) y están separados por 3-8 aa (*linkers*). La localización de los residuos de Cys está altamente conservada dentro de los módulos. A su vez, estos módulos pueden dividirse en dos tipos de submódulos (Figura 18). Por lo tanto, la Cd-MT más larga TpyrMT-2 está formada por cinco módulos, cuatro compuestos por un submódulo de tipo-1 (sm1) y la mitad del submódulo de tipo-2 ($\frac{1}{2}$ sm2), y uno por dos submódulos de tipo-1 (sm1) y un submódulo de tipo-2 (sm2), es decir $[4(\text{sm1} + \frac{1}{2} \text{sm2}) + 1(2\text{sm1} + 1 \text{sm2})]$. TtheMTT1, TtheMTT3 y TtroMTT1 están formadas por tres módulos $[2(2\text{sm1} + 1\text{sm2}) + 1(1\text{sm1} + \frac{1}{2} \text{sm2})]$. TrosMTT1, TpyrMT-1 y TtheMTT5 son las Cd-MTs más pequeñas y están formadas por dos módulos. Cada módulo de TrosMTT1 está compuesto por $(2\text{sm1} + 1\text{sm2})$, mientras que TpyrMT-1 y TtheMTT5 presentan un módulo $(2\text{sm1} + 1\text{sm2})$ y un módulo $(1\text{sm1} + \frac{1}{2} \text{sm2})$.

Así, las Cd-MTs de *Tetrahymena* parecen estar formadas por la combinación de los motivos elementales C_2X_6 y $\text{CXCX}_2\text{CXC}_2\text{X}$ (secuencias consenso), que se van repitiendo para formar unidades de longitud y complejidad crecientes. De este modo, con algunas pequeñas modificaciones, estos motivos dieron lugar a submódulos, módulos y finalmente a secuencias más complejas de metalotioneínas (Figura 18). La estructura modular de la subfamilia 7a (Cd-MTs) podría haber contribuido al inusual mayor tamaño de estas MTs, facilitando, mediante fenómenos de duplicación génica, una posible expansión de los motivos queladores de metal como mecanismo de respuesta a episodios de contaminación ambiental gradual. Si esto fuera así, se espera que las especies de *Tetrahymena* que habitasen ecosistemas muy contaminados con metales pesados presenten MTs más largas, pero esto aún no ha sido dilucidado. Por otro lado, la hipótesis de que estas repeticiones hayan sido generadas por un mecanismo de *exon-shuffling* (Patthy 1999), como se ha propuesto para algunos genes MT de metazoos (Schmitt-Wrede *et al.* 2004), parece improbable en el caso de los genes MT de *Tetrahymena*, puesto que éstos no presentan intrones (Fu y Miao 2006).

En varias proteínas de superficie de *S. cerevisiae* se ha demostrado la existencia de un proceso de duplicaciones intragénicas como mecanismo de adaptación a cambios rápidos en el ambiente (Verstrepen *et al.* 2005). Además, líneas celulares de mamíferos resistentes a Cu y Cd incrementan los niveles de MTs, y este incremento se ha atribuido, en algunos casos, a amplificación génica de MT-1 y MT-2 (Yamada *et al.* 1994). Igualmente, el número medio de copias

de los genes MT-1 del ratón se duplica tras 6 h de tratamiento con elevadas concentraciones de Cd (Koropatnick *et al.* 1985), y las copias extra de genes MT originadas son tanto transcripcionalmente competentes como inducibles (Koropatnick 1988). Una posibilidad similar parece más adecuada para los genes Cd-MTs de *Tetrahymena*.

Aunque las Cu-MTs no presentan una estructura modular tan clara como las Cd-MTs, a partir del alineamiento de sus secuencias aminoacídicas (Figura 20), se observa una organización estructural basada en repeticiones del motivo CKCX₂₋₅CXC (donde K puede estar sustituido por otro aminoácido en algunos casos). Esto sugiere que también la historia evolutiva de las Cu-MTs de *Tetrahymena* podría estar basada en fenómenos de duplicaciones intragénicas.

A.7 Historia evolutiva de las MTs de *Tetrahymena*

La baja similitud existente entre las secuencias MTs de los distintos *phyla* ilustra la extensa diversificación de los genes MT a lo largo de la evolución. En base a la gran heterogeneidad entre las MTs de distintos grupos taxonómicos, se ha propuesto la existencia de diferentes linajes de MTs, y por tanto el probable origen polifilético de estas proteínas (Tio *et al.* 2006; Pagani *et al.* 2007). Las MTs de *Tetrahymena* difieren considerablemente de las MTs de otros organismos, presentando características únicas como su mayor longitud, motivos de Cys distintos a los clásicos, y la ausencia de intrones en los genes que las codifican.

Como ya se ha indicado previamente, diversos criterios estructurales, genéticos y filogenéticos avalan la división de la familia de las MTs de *Tetrahymena* en dos subfamilias distintas. Así mismo, los análisis filogenéticos realizados por otros grupos de investigación corroboran esta separación (Santovito *et al.* 2007; Guo *et al.* 2008).

Otra característica diferencial que separa las dos subfamilias de MTs de *Tetrahymena* es la diferente utilización de los codones codificantes para el aminoácido glutamina (Gln). Los ciliados usan un código genético particular ligeramente diferente del universal, en el que los codones UAA y UAG (codones universales “stop” para genes nucleares) codifican para el aminoácido Gln, y sólo el codon UGA es el codon “stop” utilizado por estos microorganismos eucariotas, aunque existen algunas excepciones (Tourancheau *et al.* 1995; Lozupone *et al.* 2001). Todas las secuencias aminoacídicas de las MTs de *Tetrahymena* contienen residuos de Gln (desde 1 en TpyrMT-1 a 14 en TpyrMT-2). La subfamilia 7b (Cu-MTs) usa exclusivamente el codon “universal” CAA para Gln, mientras que la subfamilia 7a (Cd-MTs) preferentemente usa UAA y UAG en lugar de los codones Gln “universales” (CAA y CAG) (Figura 69). Para todas las Cd-MTs de *Tetrahymena*, la relación de codones no canónicos/canónicos es 29 (mayormente UAA) / 17 (casi exclusivamente CAA). Curiosamente, TtheMTT3 usa los cuatro posibles codones para Gln (Figura 69). Esta drástica asimetría en el uso de los codones codificantes para la Gln corrobora que las Cu-MTs de *Tetrahymena* son más similares a las MTs de vertebrados que las Cd-MTs de este ciliado. En la Figura 69, se muestra el árbol filogenético de las MTs de *Tetrahymena* inferido de sus secuencias aminoacídicas, junto con los codones Gln que utilizan los diferentes genes

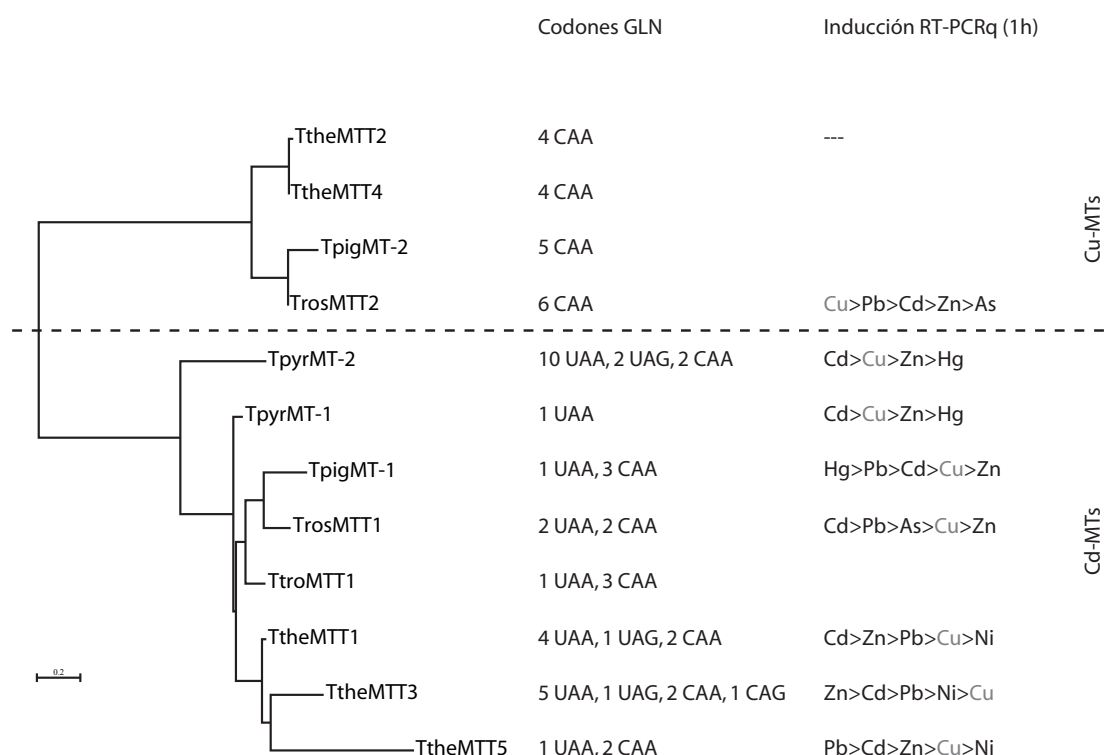


Figura 69. Árbol filogenético de las MTs de *Tetrahymena* inferido mediante el método de máxima verosimilitud (ML) (para más detalle del mismo, ver apartado A.3 de R, Figura 17). Igualmente se indican los codones codificantes para el aminoácido glutamina (Gln) para cada molécula de MT. En la columna de la derecha se indica el orden de inducción de la expresión (resultados de RT-PCR cuantitativa) para cada gen codificante de cada MT, tras la exposición durante 1 hora a distintos metales pesados como se indica en la Tabla 33.

MT y su rango de inducibilidad por metales pesados (según datos de RT-PCR cuantitativa). Estos elementos diferencian, igualmente, a ambas subfamilias de MTs de *Tetrahymena*.

Desde el punto de vista filogenético las Cu-MTs de *Tetrahymena* podrían ser más antiguas que las Cd-MTs (Gutiérrez *et al.* 2009), ya que las desviaciones del código genético presentes en ciliados surgieron de forma independiente durante el desarrollo de varios linajes del *phylum* Ciliophora y no fueron consecuencia de un único evento (Tourancheau *et al.* 1995; Lozupone *et al.* 2001). Según la hipótesis de Schultz y Yarus (1994) los ARNt^{Gln} inusuales (ARNt_{UAA}^{Gln} y ARNt_{CUA}^{Gln}) surgieron por duplicación y divergencia del canónico ARNt^{Gln} en un ciliado ancestral que utilizaba el código genético universal (Schultz y Yarus 1994; Lozupone *et al.* 2001). De acuerdo con esto, las Cu-MTs de *Tetrahymena* debieron aparecer antes que las Cd-MTs, puesto que éstas últimas usan principalmente los codones no universales UAA/UAG.

Durante los estadios tempranos de la evolución de eucariotas ya existían los dos linajes de MTs (Cu y Zn tioneínas) según varios autores (Valls *et al.* 2001; Pagani *et al.* 2007). Todos los organismos eucariotas analizados hasta ahora presentan genes que codifican para Zn- y Cu-tioneínas, excepto *S. cerevisiae*, donde sólo se han descrito dos Cu-MTs (*Cup1* y *Crs5*) (Pagani *et al.* 2007). Probablemente en las fases iniciales de la evolución la principal función de las MTs estaría más relacionada con la homeostasis de los metales esenciales (como Cu y Zn), y su expresión estaría inducida principalmente por estos metales (Binz y Kägi 1999).

La exposición a elevados niveles de Cd es un fenómeno relativamente reciente con-

secuencia de las actividades humanas, y por tanto probablemente con poca relevancia desde el punto de vista evolutivo, aunque en las épocas de gran actividad volcánica y ruptura de la corteza terrestre se puedan haber liberado grandes cantidades de Cd al ambiente (Coyle *et al.* 2002). Si asumimos estas consideraciones, posiblemente la evolución inicial de las MTs no estuvo dirigida por el Cd. Sin embargo, durante la evolución de los organismos superiores, parece que estas proteínas se hayan hecho indispensables como moléculas de protección frente a la toxicidad del Cd y otros metales pesados, más que para controlar los niveles de los metales esenciales (Klaassen *et al.* 1999).

Según varios autores, la duplicación génica parece ser el principal mecanismo implicado en la evolución de los genes MT tanto de vertebrados como invertebrados, microorganismos y plantas (Maroni *et al.* 1987; Klaassen *et al.* 1999; Valls *et al.* 2001; Tio *et al.* 2004; Trinchella *et al.* 2008). Esta hipótesis está avalada por la existencia de un patrón de repeticiones conservadas de motivos Cys en la secuencia aminoacídica de MTs de distintos organismos, y la presencia en varias especies de dos o más genes MT dispuestos en tandem en la misma región cromosómica (Tio *et al.* 2004).

Una hipótesis similar también se ha propuesto para explicar la evolución de los genes MT de *Tetrahymena*. De la similitud interna de sus secuencias se puede inferir que las distintas isoformas de Cd-MTs hayan sido originadas mediante múltiples fenómenos de duplicación génica a partir de un gen ancestral común (Boldrin *et al.* 2003; Fu y Miao 2006; Díaz *et al.* 2007). La misma afirmación es válida para las Cu-MTs (75-99 % de identidad entre las isoformas de Cu-MTs). El proceso de diversificación antes de la especiación podría haber contribuido a la baja similitud de secuencia compartida entre los genes codificantes para Cd-MTs y Cu-MTs de *Tetrahymena* (Boldrin *et al.* 2003). La reciente secuenciación completa del genoma macronuclear de *T. thermophila* ha puesto de manifiesto la existencia de numerosos ejemplos de genes duplicados en tandem, probablemente originados por fenómenos de duplicación paráloga, muchos de ellos implicados en la detección y respuesta a cambios ambientales (Eisen *et al.* 2006). Éste también es el caso de los genes de Cd-MTs y Cu-MTs de *T. thermophila*, ya que por una parte los genes *TtheMTT1* y *TtheMTT3* se localizan uno a continuación del otro en la misma región cromosómica, separados por una distancia de 1,7 kb (Díaz *et al.* 2007). Y por otra parte, los genes adyacentes *TtheMTT2* y *TtheMTT4* codifican dos proteínas idénticas, cuyo origen probablemente se debe a una duplicación génica relativamente reciente, a juzgar por la elevada similitud entre sus regiones 5' y 3'-UTR (Bakshandeh *et al.* 2004).

Aunque pensamos que la historia evolutiva de las Cd-MTs de *Tetrahymena* es difícil de reconstruir con los datos actuales y debido a la actuación de, al menos, dos factores durante la evolución de estas proteínas/genes. En primer lugar, la recombinación entre parálogos (como *unequal crossing-over* (entrecruzamiento desigual) y conversión génica), y en segundo lugar, la convergencia evolutiva de los módulos/submódulos bajo las posibles distintas presiones evolutivas surgidas simultáneamente (o no) a lo largo de la evolución, dado que las MTs son proteínas multifuncionales (Díaz *et al.* 2007). No obstante, debido a la paradigmática estructu-

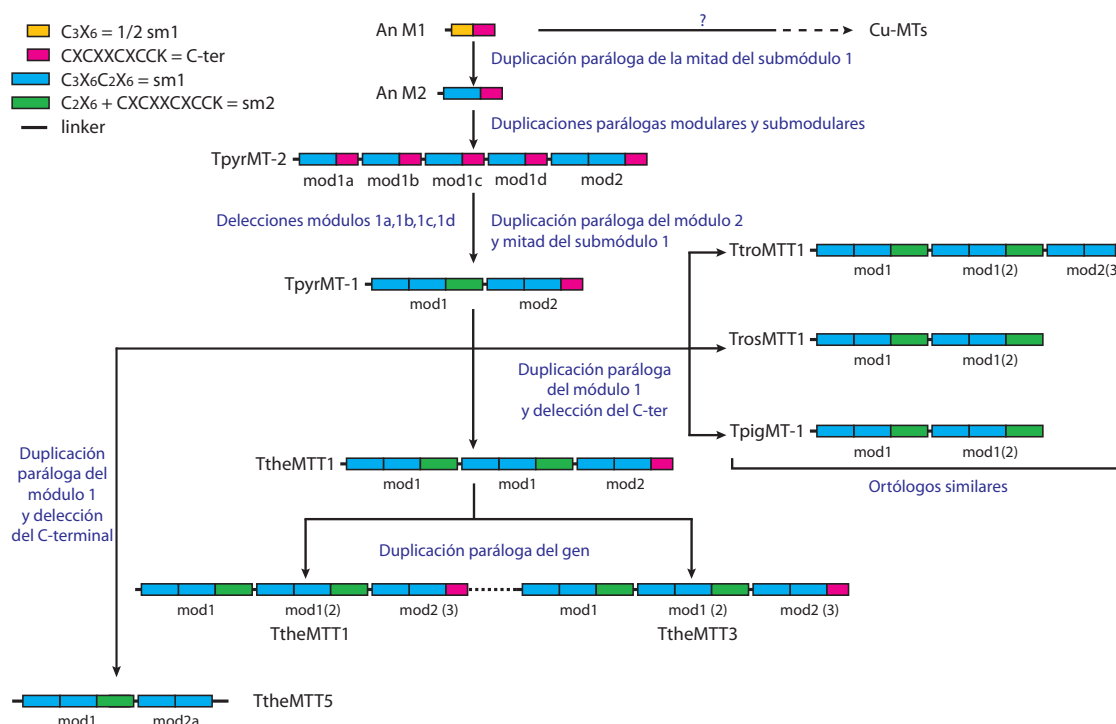


Figura 70. Modelo propuesto para una posible historia evolutiva de las Cd-MTs de *Tetrahymena* (subfamilia 7a) basado en duplicaciones de los módulos y los submódulos a partir de un módulo ancestral (AnM). AnM1: módulo ancestral de tipo 1. AnM2: módulo ancestral de tipo 2. mod1: módulo de tipo 1. mod2: módulo de tipo 2. sm1: submódulo tipo 1. sm2: submódulo tipo 2. 1/2 sm1: mitad del submódulo tipo 1. C-ter: carboxilo-terminal. Entre paréntesis se indica el número de módulo, independientemente del tipo.

ra modular presente en las Cd-MTs de *Tetrahymena*, no contemplada con tanta claridad o con la misma intensidad en otras MTs, se ha podido construir un modelo de una de las posibles historias evolutivas para estas moléculas. Así, en la Figura 70 se muestra uno de los posibles modelos de la historia evolutiva de las Cd-MTs de *Tetrahymena*, basado principalmente en su organización modular y submodular. En este modelo, un módulo ancestral de tipo 1 (AnM1) compuesto por los motivos C₃X₆ (la mitad del submódulo de tipo 1 ó 1/2 sm1) y CXCXCXCCK (motivo C-terminal de cada módulo) podría haber dado lugar a las Cd-MTs y Cu-MTs de las distintas especies de *Tetrahymena*. Como se explicó anteriormente (apartado A.3), aunque las Cu-MTs de *Tetrahymena* no presentan una estructura modular clara como las Cd-MTs, parecen estar compuestas por repeticiones de una versión ligeramente distinta del motivo C-terminal (CXCXCXCCK).

El módulo ancestral de tipo 2 (AnM2) podría haber surgido a partir del módulo ancestral de tipo 1 (AnM1), tras una duplicación paráloga de la mitad del submódulo 1 (1/2 sm1) y perdiendo un residuo de Cys (Figura 70). De este modo el ancestro de la proteína actual TpyrMT-2, podría haber surgido mediante un proceso de cuatro duplicaciones parálogas del AnM2 (que corresponderían a los actuales módulos 1a, 1b, 1c y 1d de TpyrMT-2) y una duplicación del submódulo de tipo 1 (sm1) dando lugar al actual módulo 2 (compuesto por dos sm1 y medio sm2), presente en las Cd-MTs; TpyrMT-1 y TpyrMT-2 (Figura 70). Con la delección de los cuatro módulos de tipo 1 (mod1a-d) y una duplicación paráloga intrasubmodular de 1/2 sm1 (C₂X₆), surgió un nuevo submódulo: el submódulo 2 completo (sm2), presente en TpyrMT-1 (MT con

una estructura bimodular) (Figura 70).

Otros diferentes ortólogos podrían haber aparecido en especies relacionadas del género *Tetrahymena* a partir de esta organización estructural (Figura 70). Por ejemplo, la TtheMTT1 podría haberse originado a partir de una duplicación paráloga del módulo 1, presentando así una estructura trimodular. Posteriormente, una duplicación paráloga completa del gen *TtheMTT1* habría dado lugar a las dos isoformas TtheMTT1 y TtheMTT3 (79,6 % de identidad entre ambas) (Figura 70). Una duplicación paráloga del módulo 1 con una delección en el C-terminal podría haber originado la TtheMTT5 (Figura 70). Procesos similares que implicaron duplicaciones modulares o submodulares (con o sin delecciones), podrían haber dado lugar a la formación de ortólogos MT similares que presentan las distintas especies de *Tetrahymena* (Figura 70). Este modelo coincide con el árbol filogenético (Figuras 17 o 69) obtenido para las Cd-MTs de *Tetrahymena*.

A.8 Análisis de la expresión de los genes MTs de *Tetrahymena*

La expresión de los genes MTs es inducible por una variedad de estímulos, muchos de ellos pueden considerarse como factores que desencadenan estrés celular (exposición a metales, estrés oxidativo, alta o baja temperatura, cambios de pH, inanición, hormonas, radiaciones, etc.) (Kägi 1993; Haq *et al.* 2003), por lo que a las MTs se les considera proteínas multiestrés, estando implicadas en una gran variedad de funciones. Más de medio siglo después desde que se descubriese la primera MT, aún no se ha podido determinar el principal papel biológico de estas proteínas (Palmiter 1998). Algunas funciones atribuidas a estas proteínas son la homeostasis de metales esenciales, la protección frente a la toxicidad de metales y xenobióticos o la captación de especies reactivas de oxígeno (Palmiter 1998; Klaassen *et al.* 1999; Coyle *et al.* 2002). A pesar de su carácter multifuncional, no parece que las MTs sean proteínas esenciales, aunque confieren una ventaja adaptativa ante situaciones de estrés (Klaassen *et al.* 1999; Hughes y Sturzenbaum 2007).

Una de las características universales de los genes que responden ante una situación de estrés celular es la rapidez en su expresión. En general, la expresión de los genes MT se induce rápidamente después de una breve exposición de las células al metal. De los resultados derivados del análisis de la expresión de algunos genes MT de *Tetrahymena* sabemos que ya a 1 h de tratamiento con el metal existe una considerable expresión de estos genes, y que en general es mayor que tras 24 h de exposición (Figuras 21 y 22). Otros autores han demostrado que el incremento de la expresión se da incluso 30 minutos después de la exposición de las células al metal (Shang *et al.* 2002; Dondero *et al.* 2004; Boldrin *et al.* 2006) u otros agentes estresantes (Guo *et al.* 2008). Dondero y colaboradores (2004) han detectado que tras 1 hora de exposición al Cd, *T. thermophila* duplicaba la cantidad de proteína TtheMTT1 respecto a los niveles basales, lo cual refleja la rápida expresión y traducción en respuesta al metal. Como ya se indicó en el apartado A.1, la ausencia de intrones de los genes MT de *Tetrahymena* podría ser

una de las causas de su rápida respuesta transcripcional a la presencia del metal, aunque como también se dijo, no parece ser un requisito imprescindible para una rápida transcripción.

A.8.1 Carácter multiestrés de las MTs de *Tetrahymena*

En el presente trabajo de tesis doctoral se compara por primera vez la expresión de las tres Cd-MTs de *T. thermophila*, junto con el análisis de la expresión de las únicas Cd-MT y Cu-MT descritas en *T. rostrata* (Figuras 21 y 22). En ambas especies, los genes MT se inducen en respuesta a diferentes tipos de estrés (exposición a metales, pH ácido o básico, alta temperatura, estrés oxidativo e inanición) confirmando el carácter multiestrés de las MTs de *Tetrahymena*. Coincidiendo con esto, otros autores también han demostrado la sobreexpresión de genes MT en otras especies de *Tetrahymena* en respuesta a distintos tipos de estrés: *TtheMTT1* (Dondero *et al.* 2004), *TpyrMT-1* y *TpyrMT-2* (Fu y Miao 2006) y *TpigMT-1* (Guo *et al.* 2008).

Además de los resultados que aquí se presentan, ya publicados (Díaz *et al.* 2007; Amaro *et al.* 2008), otros investigadores han analizado la expresión de otras isoformas MT en distintas especies de *Tetrahymena*, igualmente mediante RT-PCR cuantitativa (Dondero *et al.* 2004; Fu y Miao 2006; Santovito *et al.* 2007; Guo *et al.* 2008). Sin embargo, estos datos cuantitativos no son fácilmente comparables, debido a las diferentes condiciones experimentales empleadas por los distintos autores (medio y condiciones de cultivo, concentración de metal y/o duración del tratamiento), junto con los distintos protocolos de RT-PCR cuantitativa (RT-PCRq) utilizados. Numerosos trabajos han demostrado la existencia de variaciones significativas entre los resultados de RT-PCRq de distintos laboratorios incluso empleando muestras idénticas (Bustin 2000). No obstante y a pesar de estas dificultades, podemos llevar a cabo una comparación e inferir información de tipo cualitativo a partir de los resultados de los distintos grupos de investigación. En la Tabla 33 se resumen los diferentes patrones de inducción relativa de cada gen en respuesta a distintos metales pesados, así como las condiciones experimentales de los distintos estudios llevados a cabo.

Todos los genes Cd-MTs analizados en este trabajo se inducen con mayores niveles de expresión en respuesta a Cd que a Cu (Cd>Cu) (Figuras 21 y 22), y lo mismo sucede con las Cd-MTs aisladas en otras especies de *Tetrahymena* (Tabla 33). Por el contrario la expresión de *TrosMTT2* (hasta ahora el único gen Cu-MT cuya expresión ha sido analizada por RT-PCRq) se induce principalmente por Cu (Cu>Cd) (Figura 22, Tabla 33). Este patrón de inducción se mantiene para todos los genes, independientemente de la duración del tratamiento, concentración del metal, etc., ratificando de nuevo la división de las MTs de *Tetrahymena* en las dos subfamilias 7a (Cd-MTs) y 7b (Cu-MTs). El Cu apenas es capaz de estimular la expresión de los tres genes Cd-MTs de *T. thermophila*, al igual que ocurre con el Ni (independientemente del tiempo de tratamiento) (Tabla 33). El Cu sólo induce la expresión de *TtheMTT5* dos veces por encima de los niveles basales, valor no significativo desde el punto de vista estadístico. La falta de respuesta de estos tres genes Cd-MT al Cu podría explicarse por la existencia en *T. thermophila* de

Gen MT	Orden de inducción relativa en respuesta a metales	Tratamiento		Medio	Especie	Referencia
		Concentración	Duración			
<i>TpigMT-1</i>	Hg > Pb > Cd > Cu > Zn	Cd 44,5 µM Cu 630 µM	1 h	PPY	<i>T.pigmentosa</i> cepa HG2	(Guo et al. 2008)
<i>TpyrMT-1</i>	Cd > Cu > Zn > Hg	Zn 500 µM	1 h	PPY	<i>T.pyrififormis</i> cepa GL	(Fu y Miao 2006)
<i>TpyrMT-2</i>	Cd > Cu > Zn > Hg	Pb 603 µM Hg 10 µM	1 h	PPY		(Fu y Miao 2006)
<i>TtheMTT1</i>	Cd > Hg > Cu > Zn	Cd 20 µM Cu 20 µM Zn 20 µM Hg 20 µM	30 min	PPY	<i>T.thermophila</i> cepa CU428	(Dondero et al. 2004)
<i>TtheMTT5</i>	Cd > Cu > Zn	Cd 44 µM Cu 630 µM Zn 229 µM	1 h	SPP	<i>T.thermophila</i> cepa CU428	(Santovito et al. 2007)
<i>TtheMTT1</i>	Cd > Zn > Pb > Cu > Ni		1 h	PP210	<i>T.thermophila</i> cepa SB1969	(Díaz et al. 2007)
<i>TtheMTT1</i>	Cd > Pb > As > Cu > Zn > Ni		24 h	PP210		Este trabajo
<i>TtheMTT3</i>	Zn > Cd > Pb > Ni > Cu	Cd 44,5 µM	1 h	PP210		
<i>TtheMTT3</i>	Cd > Zn > As > Ni > Cu > Pb	Cu 135 µM	24 h	PP210		
<i>TtheMTT5</i>	Pb > Cd > Zn > Cu > Ni	Zn 3,82 mM	1 h	PP210		
<i>TtheMTT5</i>	Pb > As > Cd > Cu > Zn > Ni	Pb 965 µM	24 h	PP210		
<i>TrosMTT1</i>	Cd > Pb > As > Cu > Zn	Ni 1,70 mM	1 h	PP210	<i>T.rostrata</i>	(Amaro et al. 2008)
<i>TrosMTT1</i>	Pb > Cd > As > Zn > Cu > Ni	As 100 µM	24 h	PP210	cepa ID-3	Este trabajo
<i>TrosMTT2</i>	Cu > Pb > Cd > Zn > As		1 h	PP210		
<i>TrosMTT2</i>	Cu > Zn > Cd > Pb > Ni		24 h	PP210		

Tabla 33. Análisis comparativo, por RT-PCRq, de la expresión de los genes MT de diferentes especies del género *Tetrahymena* obtenidos por distintos grupos de investigación. PPY: Proteosa peptona al 2 % y extracto de levadura al 0,1 %. PP210 y SPP: ver Tabla 6).

2 genes Cu-MTs (*TtheMTT2* y *TtheMTT4*) específicos, posiblemente encargados de la detoxificación de este metal pesado (Boldrin *et al.* 2002). Y algo similar ocurre con el gen *MTT1* (Cd-MT) de *T. rostrata*, especie que también presenta al menos un gen de Cu-MT (*TrosMTT2*) (Tabla 33). Esto mismo se refleja en el hecho de que la exposición a la mezcla Cd+Cu induce la expresión de *TtheMTT1*, *TtheMTT3* y *TtheMTT5* a unos niveles similares que cuando la célula es expuesta solamente a Cd (Figura 21).

Aunque debemos tener en cuenta que los resultados de RT-PCRq obtenidos por diversos grupos no son comparables, junto a que cada grupo ha utilizado concentraciones distintas de metal y en condiciones diferentes (como se comentó anteriormente), nos atrevemos a realizar la siguiente consideración: si comparamos los patrones de inducción temprana (1 h) de las distintas isoformas de Cd-MTs con la historia evolutiva que proponemos para las mismas, se observa que las Cd-MTs que, según nuestro modelo, aparecieron a partir del módulo ancestral (*TpyrMT-2*, *TpyrMT-1*) son inducidas preferentemente por Cd y Cu (Figura 69). Por el contrario, para las Cd-MTs que se originaron a partir de la estructura de un ancestro de *TpyrMT-1* (como *TtheMTT1* y *TtheMTT3*, *TtheMTT5*, *TrosMTT1*, *TpigMT-1* y *TtroMTT1*) (Figura 69), el Cu ocupa la última o penúltima posición en cuanto a inductor de su expresión. Por el contrario, la expresión de estas MTs se induce principalmente por Cd, Pb, Hg o As. Por tanto, podría considerarse que en las etapas “más recientes” de la historia evolutiva de las Cd-MTs de *Tetrahymena*, estas proteínas hayan cobrado más importancia como sistema de protección frente a la toxicidad de los metales pesados no esenciales (Figura 69).

Entre los metales no esenciales, el Pb es uno de los mejores inductores de la expresión de los genes Cd-MTs de *Tetrahymena*, ya que induce un elevado nivel de expresión en las tres

isoformas Cd-MTs de *T. thermophila*, e igualmente en *TrosMTT1* y *TrosMTT2* (Figuras 21 y 22). De hecho, el Pb es junto al Cd el mejor inductor de la expresión de *TtheMTT5* (Figura 21), y de *TpigMT-1* junto al Hg (Guo *et al.* 2008). *In vivo* se ha descrito que este metal induce la síntesis de MTs en humanos (Church *et al.* 1993), ratas (Ikebuchi *et al.* 1986) y en el pez *Tilapia* junto con el Zn y Cd (Cheung *et al.* 2005). Por otro lado, analizando el transcriptoma de plantas se ha comprobado que muchos genes presentan un patrón de expresión similar bajo exposición a Cd o Pb (Kovalchuk *et al.* 2005; Liu *et al.* 2009). Además, se ha demostrado *in vitro* la capacidad del Pb de interaccionar con Cd-MTs desplazando los iones de Cd unidos previamente a la metalotioneína (Erk y Raspor 2001).

El Zn está considerado como un inductor natural de la biosíntesis de MTs en mamíferos (Kägi 1993). Cd y Zn son metales pesados similares, de hecho el Zn puede interaccionar con Cd-MTs desplazando al Cd y viceversa, y además el Zn puede inducir la expresión de CdMTs (Klaassen *et al.* 1999; Coyle *et al.* 2002; Haq *et al.* 2003). Al igual que el Cd, la exposición a Zn durante 1 hora es un buen inductor de la expresión de los genes de Cd-MTs analizados en este trabajo: *TtheMTT1* (9x), *TtheMTT3* (14,4x), *TtheMTT5* (32x) y *TrosMTT1* (60,6x). Es el mejor inductor de la expresión de *TtheMTT3* y el segundo de *TtheMTT1*. Sin embargo apenas induce la expresión del gen codificante para la Cu-MT *TrosMTT2*. En el caso de *T. thermophila* parece más importante la respuesta temprana al Zn, puesto que una exposición corta (1 h) al metal es uno de los mejores inductores de la expresión de *TtheMTT1* y *TtheMTT3*, mientras que tras una exposición prolongada (24 h) los niveles de ARNm de las 3 Cd-MTs caen a los niveles basales (Figura 21). Para la Cd-MT de *T. rostrata* se observa una respuesta similar, la exposición corta a Zn induce más eficazmente la expresión de *TrosMTT1* (Figura 22). Y aparentemente, respecto a la expresión del gen *TrosMTT2* es indiferente que la exposición sea corta o larga. Nilsson (2003), demostró que *Tetrahymena* tolera altas concentraciones de Zn. Cuando el ciliado era expuesto a una alta concentración subletal de este metal, aumentaba su tiempo de generación y se reducía la movilidad celular. Sin embargo, este efecto negativo inicial, consecuencia de la entrada masiva del Zn al interior celular, desaparecía a lo largo del tiempo. La rápida recuperación del ciliado indica la actuación de un rápido mecanismo de respuesta frente al exceso de Zn intracelular. Esta respuesta podría estar mediada en parte por las Cd-MTs del ciliado, puesto que según nuestros resultados, en las dos especies (*T. thermophila* y *T. rostrata*) la expresión de estos genes aumenta tras 1 hora de exposición y vuelve a los niveles basales después de 24 horas (Figuras 21 y 22). El Zn es también un buen inductor de la expresión de genes de Cd-MTs de *T. pyriformis* *TpyrMT-1* y *TpyrMT-2* (Fu y Miao 2006) (Tabla 33). Sin embargo, Dondero *et al.* (2004) observaron que *TtheMTT1* se sobreexpresaba en respuesta a Cd, Hg y Cu pero no a Zn. En *T. pigmentosa* (Guo *et al.* 2008) parece que el Zn tampoco es un buen inductor de la expresión de la Cd-MT *TpigMT-1*. Las diferentes respuestas observadas probablemente se deban a las diferentes condiciones de exposición al metal en los distintos estudios. Por ejemplo, la concentración de Zn empleada por Dondero *et al.* (2004) es considerablemente menor a la empleada en nuestros experimentos, y esto podría ser la causa de que estos autores no ob-

servasen inducción del gen *TtheMTT1* por Zn.

Numerosos estudios han demostrado que el As induce la expresión de genes de estrés como los que codifican HSPs (proteínas de choque térmico) y MTs (Del Razo *et al.* 2001; Rossi *et al.* 2002; Cui y Okayasu 2008). Cuando *Tetrahymena* es expuesta a As (As^{5+}), este metaloide ocupa el segundo o tercer lugar como inductor de los genes de Cd-MTs *TtheMTT1*, *TtheMTT3*, *TtheMTT5* y *TrosMTT1*; mientras que el gen *TrosMTT2* (Cu-MT) no se induce o incluso presenta una expresión menor que la basal (Figura 22, B). El As es un potente inductor de estrés oxidativo, promoviendo la producción de ROS y radicales libres, por lo que se cree que la sobreexpresión de MTs durante la exposición a As sea un mecanismo de defensa frente a la producción de ROS, más que para quelar los iones de As (Del Razo *et al.* 2001). Como muestran los resultados de RT-PCR cuantitativa (Figura 21), los niveles de *TtheMTT5* aumentan considerablemente ante la presencia de este metal, mientras que *TtheMTT1* y *TtheMTT3* lo hacen de forma discreta. Igualmente, ante el estrés oxidativo causado por paraquat (PQ), de nuevo es *TtheMTT5* el que presenta mayores niveles de expresión, lo que podría sugerir que la proteína TtheMTT5 desempeñe un papel más importante como molécula antioxidante en *T. thermophila*, respecto al resto de las isoformas TtheMTT1 y TtheMTT3.

Las MTs desempeñan un importante papel en la protección de la célula frente al estrés oxidativo (Viarengo *et al.* 2000). Además de lo indicado anteriormente, en varias especies de *Tetrahymena* se ha detectado que el estrés oxidativo inducido por H_2O_2 o PQ incrementa significativamente la expresión de genes MT, incluidos los analizados en este trabajo (Figura 21, D). Los genes de Cd-MTs *TtheMTT1* (Dondero *et al.* 2004), *TpyrMT-1* (Fu y Miao 2006) y *TpigMT-1* (Guo *et al.* 2008) se sobreexpresan tras la exposición de la célula a H_2O_2 . Igualmente, la expresión de *TtheMTT5* (Figura 21, D) y *TrosMTT2* (Figura 22, D) es inducida por PQ. El herbicida PQ induce estrés oxidativo mediante la producción de ROS a través de un ciclo redox (*redox cycling*) (Kappus y Sies 1981; Suntres 2002), y tanto el PQ como el H_2O_2 son buenos inductores de la biosíntesis de MTs (Bauman *et al.* 1992). La respuesta de las MTs a estrés oxidativo debe ser muy rápida, ya que la sobreexpresión de los genes MT se detecta al poco tiempo de la exposición a H_2O_2 (15-30 minutos) (Dondero *et al.* 2004; Fu y Miao 2006; Guo *et al.* 2008), y la sobreexpresión de *TpigMT-1* detectada tras 15 minutos de exposición a H_2O_2 desciende a los niveles basales a los 30 minutos (Guo *et al.* 2008).

Uno de los tipos de estrés ambientales más frecuentes que sufre la célula es la ausencia de nutrientes (inanición). Se ha demostrado que este tipo de estrés induce también la expresión de genes MT en otros organismos, como el gen *CUP1* de *S. cerevisiae* (que codifica una Cu-MT), que también se induce por la falta de glucosa (Tamai *et al.* 1994). El estado de inanición, principalmente tras 24 h, induce la biosíntesis de varias MTs en *Tetrahymena*. Mientras que los niveles de expresión de *TrosMTT1* y *TrosMTT2* aumentaron considerablemente tras 24 h de inanición, en el caso de *TtheMTT5* el incremento fue más moderado (tres veces los niveles basales) (Figuras 21 y 22). Recientemente se ha analizado el patrón de expresión génica de *T. thermophila* durante los tres estados fundamentales de su ciclo biológico (cre-

cimiento, inanición y conjugación) mediante la elaboración de un *microarray* (Miao et al. 2009) (datos mostrados en la base de datos *Tetrahymena Gene Expression Database* (TGED)). Según este análisis, *TtheMTT5* es el gen de Cd-MT que mayores niveles de expresión presenta desde las 9 hasta las 24 horas de inanición (Figura 71, A), lo que concuerda con nuestros resultados de RT-PCRq (Figura 21). En cualquier caso este tipo de estrés no parece un gran inductor de la expresión de las tres Cd-MTs de *T. thermophila*.

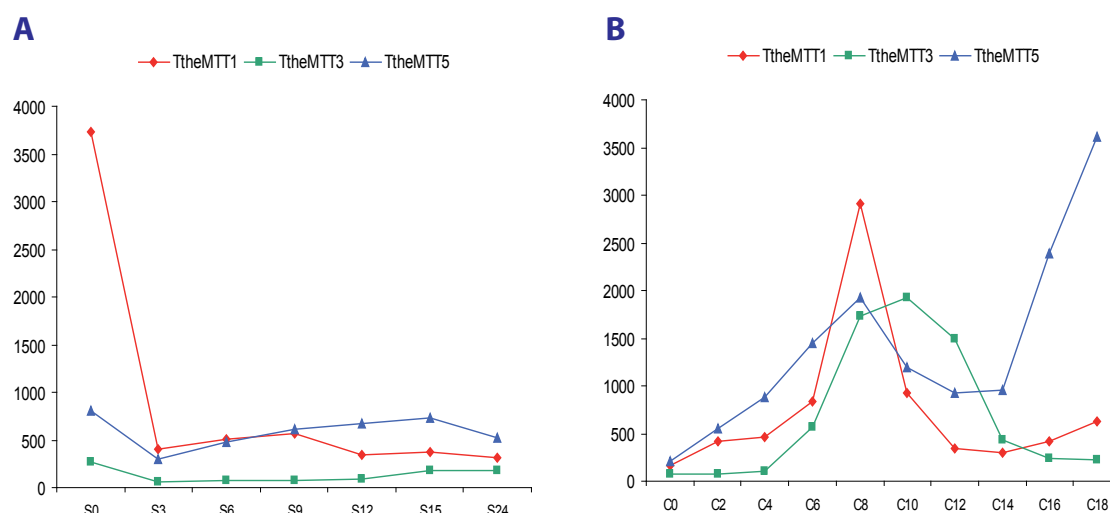


Figura 71. Perfiles de expresión de los genes *MTT1*, *MTT3* y *MTT5* de *T. thermophila* durante la inanición (A) (S0-S24: 0-24 h) y conjugación (B) (C0-C18: 0-18 h). Datos obtenidos a partir de los resultados de Miao et al. (2009) a través de la base de datos *Tetrahymena Genome Expression Database* (TGED).

Sin embargo, los resultados de Miao y colaboradores (2009) (y mostrados en la base de datos TGED) muestran que la expresión de *TtheMTT1*, *TtheMTT3* y *TtheMTT5* experimenta un considerable incremento durante la conjugación (proceso inducido y desarrollado en inanición), que es especialmente patente en el caso de *TtheMTT5* (Figura 71, B). La expresión de *TtheMTT1* y *TtheMTT3* alcanzan los máximos niveles entre las 8 y las 10 horas del inicio de la conjugación respectivamente (que corresponde con la etapa de diferenciación de micronúcleo a macronúcleo, después de las dos mitosis postcigóticas), para después disminuir progresivamente (Figura 71, B). Por el contrario, *TtheMTT5* presenta dos picos de máxima expresión, hacia las 8 (junto con las otras dos Cd-MTs) y 18 horas desde el inicio del proceso de conjugación (que corresponde con la etapa de diferenciación del micronúcleo a macronúcleo, una vez que los exconjugantes ya están separados) (Figura 71, B). Igualmente, en las genotecas de expresión de células de *T. thermophila* en conjugación disponibles en la base de datos NCBI, aparecen más ESTs correspondientes a *TtheMTT5* que a *TtheMTT1*. Actualmente desconocemos cuál puede ser la función o funciones de estas MTs tanto en inanición como durante la conjugación de *T. thermophila*.

Al igual que *TtheMTT3* y *TtheMTT1*, los genes MT de *T. rostrata* (*TrosMTT1* y *TrosMTT2*) no se ven afectados por un cambio de pH del medio (Figuras 21, D y 22). Por el contrario, la expresión de *TtheMTT5* se incrementa drásticamente tras 24 horas de exposición a pH ácido

(pH 5), y menos drásticamente a pH básico (pH 9) (Figura 21, D). Se sabe (Klaassen *et al.* 1994) que el pH 5 o menor puede degradar Cd-MTs (sin desplazar el Cd), y también los átomos de Zn pueden ser desplazados de una Cd-MT iniciando su degradación. El gen *TtheMTT5* es, de todos los genes Cd-MTs de *T. thermophila*, el que se expresa (probablemente también a nivel basal) con mayores niveles frente a muy diversos agentes estresantes (Figura 21). Si asumimos que el pH 5 degrada por igual a las tres Cd-MTs (punto que desconocemos), la restauración de los niveles basales conllevaría una inducción de la expresión proporcional a los mismos, lo que explicaría la mayor inducción de este gen frente al resto de Cd-MTs. Por otro lado, también se podría contemplar la posibilidad de interpretar estos resultados en términos de expresión diferencial ligada al pH con respecto al gen *TtheMTT5*. Para alcanzar, en el futuro, una interpretación más correcta es necesaria una mayor investigación de este aspecto.

Las MTs de *T. rostrata* parecen ser más sensibles al estrés térmico que las Cd-MTs de *T. thermophila*. Mientras que la expresión de *TtheMTT1*, *TtheMTT3* y *TtheMTT5* resultó similar a los niveles basales (Figura 21, D) o ligeramente superior (Dondero *et al.* 2004) tras un choque térmico (42°C), los genes *TrosMTT1* y *TrosMTT2* incrementan su expresión más de 100 veces (Figura 22). Estas diferencias podrían deberse a que *T. rostrata* es un parásito facultativo de varios invertebrados, que presenta además quistes de resistencia y un proceso de autogamia (Gutiérrez 1985). Por lo tanto, al tratarse de un parásito, *T. rostrata* probablemente sea más sensible a cambios de temperatura que otras especies de *Tetrahymena* (Gutiérrez 1985; Wilson *et al.* 1998). En el molusco *Crassostrea virginica* se ha detectado, por RT-PCRq, un incremento de hasta 3,7 veces la inducción de genes MTs cuando se expone a 40°C durante 1 h, pero no se induce expresión significativa a 28 ó 12°C (Ivanina *et al.* 2009)

Por el contrario, la baja temperatura (4°C) no afecta la expresión de ninguno de los genes MTs de *Tetrahymena* analizados (Figuras 21 y 22). Coincidiendo estos resultados con aquellos publicados por Dondero *et al.* (2004), quienes tampoco detectaron sobreexpresión del gen *TtheMTT1* tras un choque térmico a 0°C.

A.8.2 Relevancia biológica de las MTs de *Tetrahymena*. Diferentes funciones para las distintas isoformas de MTs y participación en mecanismos de protección cruzada frente a diversas condiciones de estrés (*cross-protection*)

En *Tetrahymena*, como en otros organismos, la expresión de las MTs se induce rápidamente cuando la célula es expuesta a distintos metales pesados. A partir del estudio de la expresión de los genes y la biosíntesis de las MTs de *Tetrahymena*, se ha propuesto que las MTs del ciliado desempeñen una clara función en la homeostasis y detoxificación de metales (Piccinni y Albergoni 1996; Dondero *et al.* 2004). Por otro lado, aunque todas MTs de *Tetrahymena* aumentan su expresión cuando la célula es expuesta a metales, cada isoforma presenta un patrón de inducción característico o diferencial (en las condiciones ensayadas). Del mismo modo, a pesar del carácter multiestrés de las MTs de *Tetrahymena*, no todas las MTs de *Tetrahymena*

se inducen por los mismos tipos de estrés ambiental. Ciertas diferencias se observan entre las isoformas génicas de la misma subfamilia dentro de la misma especie de *Tetrahymena* (por ejemplo entre *TtheMTT1*, *TtheMTT1* y *TtheMTT5*), o incluso entre MTs de especies distintas, por ejemplo entre *TtheMTT3* y *TrosMTT1*. La existencia de un alto número de isoformas de MTs (cinco) para un microorganismo eucariota como es *T. thermophila*, plantea la cuestión de si desempeñan diferentes funciones biológicas en la misma célula, o si por el contrario son sólo el resultado de fenómenos de duplicación y realizan las mismas funciones. En células de vertebrados las diferentes isoformas de MTs no sólo tienen distintos niveles basales de expresión, sino que se expresan (y probablemente funcionan) diferencialmente unas isoformas respecto de otras, tanto dentro de una misma célula como entre células de diferentes tejidos (Miles *et al.* 2000).

Las tres isoformas de Cd-MTs de *T. thermophila* presentan un patrón de inducción y niveles de expresión diferentes. En general, e independientemente del agente inductor utilizado, podemos decir que el orden de los niveles de inducción de su expresión es *TtheMTT5* > *TtheMTT1* > *TtheMTT3*, siendo *TtheMTT5* el más inducible de los tres genes, y el que responde a un mayor número de condiciones de estrés. (Figura 21). Por el contrario, *TtheMTT3* es el gen Cd-MT que menores niveles de inducción alcanza de *T. thermophila* (Figura 21, B). *TtheMTT3* es la única Cd-MT con residuos de His en su secuencia (Figura 18), lo que podría aumentar la afinidad de la proteína por el Zn, como se ha descrito para MTs de otros organismos (Blindauer 2008). Esta MT podría estar implicada principalmente en la homeostasis de este metal esencial, lo que justificaría que la expresión de *TtheMTT3* alcance los mayores niveles cuando la célula es expuesta a este metal.

Los parálogos *TtheMTT1* y *TtheMTT3* codifican para dos isoformas de Cd-MTs muy similares (79,6 % de identidad), y sin duda han sido originados por un fenómeno de duplicación génica. Las diferencias en el patrón de expresión génica son el primer paso en la divergencia funcional de dos genes originados por duplicación, y aumenta la probabilidad de que ambos genes sean mantenidos en el genoma del organismo (Taylor y Raes 2004; Kondrashov y Kondrashov 2006). Las diferencias en el patrón de expresión de dos genes originados por duplicación se deben principalmente a la divergencia de sus regiones promotoras, más que a la de sus regiones codificantes; aunque diferencias en la estabilidad del ARNm y la estructura de la cromatina puedan favorecer diferencias en la expresión (Li *et al.* 2005). El hecho de que el promotor de *TtheMTT3* presente un menor número de motivos MTCM1 puede ser una de las razones por las que este gen presente menores niveles de inducción que *TtheMTT1*.

Puesto que la duplicación que originó *TtheMTT2/TtheMTT4* es más reciente que la que originó *TtheMTT1/TtheMTT3*, se espera que el patrón de expresión de los dos genes *TtheMTT2* y *TtheMTT4* sea más similar entre sí. Desafortunadamente la expresión de *TtheMTT2* y *TtheMTT4* no se puede diferenciar puesto que ambos genes presentan una identidad nucleotídica del 99 %.

Con los datos actuales es difícil asignar funciones diferenciales a las restantes Cd-MTs

de *T. thermophila* de una manera inequívoca. Sin embargo, en base a las diferencias en los patrones de expresión bajo la acción de diferentes agentes estresantes y el grado o nivel de expresión, podríamos hacer algunas consideraciones sobre sus posibles funciones diferenciales. Podríamos considerar a TtheMTT5 como una proteína de estrés general (sin descartar su función contrarestando el efecto tóxico del Cd y otros metales), por sus mayores niveles de expresión y respuesta a inductores de muy diversa naturaleza. Por otro lado, la isoforma TtheMTT1 (más similar a la TtheMTT3), podría actuar como una MT secundaria o de “apoyo” en la respuesta a estrés frente a metales fundamentalmente, aunque también se expresa bajo otras circunstancias. Esperamos tener un mayor conocimiento de la función y necesidad de estas proteínas en condiciones basales y bajo estrés celular cuando en un futuro próximo obtengamos cepas *knockout* para cada uno de estos genes de *T. thermophila*.

La inducción de la expresión de varios genes MT de *Tetrahymena* como respuesta a distintas condiciones de estrés celular (metales pesados, choque térmico, inanición, etc.) plantea la posibilidad de que cuando la célula es expuesta a un tipo de estrés específico (por ejemplo metales pesados), la biosíntesis de MTs como respuesta a ese estrés permita que la célula desarrolle tolerancia a otros tipos de estrés distintos (p. ej. choque térmico, estrés oxidativo, etc.). Este fenómeno conocido como *cross-protection* se ha descrito en varios organismos, y sugiere que las respuestas frente a distintos tipos de estrés solapan parcialmente (Estruch 2000), y en ella participan proteínas de estrés general, como las proteínas HSPs y MTs (Piano *et al.* 2004).

A.9 Análisis de la región promotora de TtheMTT5. El motivo MTCM1 interacciona con varias proteínas de *T. thermophila*, posiblemente factores de transcripción de tipo bZIP

La rápida expresión de los genes de MTs en respuesta a metales, como también se observa en *T. thermophila*, requiere un mecanismo de regulación génica eficaz. En vertebrados, plantas y algunos invertebrados, la inducción de la expresión de las MTs por metales implica la unión del factor de transcripción con dedos de Zn MTF-1 a los elementos MREs localizados en múltiples copias a lo largo de los promotores de genes MTs (Haq *et al.* 2003).

Aunque en el genoma de *T. thermophila* aparecen numerosas proteínas con dedos de Zn, ninguna de ellas parece ser un ortólogo del factor MTF-1 (Díaz *et al.* 2007). La región 5'UTR de TtheMTT5 (Figura 23) no contiene MREs, así como tampoco se han encontrado estos elementos en los promotores de TtheMTT1 y TtheMTT3 (Shang *et al.* 2002; Dondero *et al.* 2004; Díaz *et al.* 2007). Por el contrario, otros investigadores han identificado *in silico* la presencia de hipotéticos motivos MREs y AREs en los promotores de varios genes MT de *Tetrahymena* (Boldrin *et al.* 2003; Boldrin *et al.* 2008), aunque ninguno de ellos han sido identificados experimentalmente.

Ante la ausencia de MREs canónicos en los promotores de los genes MTs de *Tetrahymena*, se piensa que la expresión de estos genes esté mediada por otros factores de transcripción distintos a MTF-1 (Dondero *et al.* 2004; Díaz *et al.* 2007). La expresión de las proteínas de estrés

HSPs en *T. thermophila* está mediada por factores de transcripción que interaccionan con los elementos HSEs y GATA presentes en los promotores de estos genes (Barchetta *et al.* 2008). Dondero *et al.* (2004) han descrito la existencia de motivos similares a GATA en el promotor de *TtheMTT1*, aunque tampoco han sido confirmados experimentalmente.

En el nemátodo *C. elegans* se ha demostrado que la expresión de los dos genes de MTs *mtl-1* y *mtl-2* no está mediada por MREs (Moilanen *et al.* 1999). Tampoco se han encontrado genes homólogos a MTF-1 en el genoma secuenciado de *C. elegans* (Swain *et al.* 2004). La expresión constitutiva de los genes *mtl-1* y *mtl-2* está controlada por el factor ELT-2 (*Erythroid-like Transcription factor 2*) que reconoce los elementos GATA presentes en el promotor de estos genes. Sin embargo, para la activación de la transcripción en presencia de metales se requiere uno o más factores de transcripción adicionales, que según los autores podrían ser de tipo AP-1 o Sp-1 (Moilanen *et al.* 1999).

En el promotor del gen *cup1* (Cu-MT) de *S. cerevisiae* (organismo filogenéticamente más relacionado con metazoos que *Tetrahymena*) tampoco aparecen MREs. En cambio, el promotor de este gen contiene elementos UAS, que son reconocidos por el factor de transcripción ACE-1, que media la inducción del *cup1* en respuesta a Cu y Ag. Tampoco ACE-1 parece ser ortólogo de MTF-1 (Imbert *et al.* 1990).

Actualmente, el conocimiento sobre la regulación de los promotores de genes de *Tetrahymena* es muy limitado. Muy pocos promotores han sido analizados experimentalmente (Smith *et al.* 2004; Barchetta *et al.* 2008), y ninguno de ellos corresponde a promotores de genes de MTs. Mediante el análisis *in silico* de la región 5'UTR de *TtheMTT5*, se identificó la presencia del motivo conservado MTCM1 (5' GTGTGAATCATGAGT 3') que aparece también en los promotores de varios genes MT de distintas especies de *Tetrahymena* (*TpyrMT-1*, *TtheMTT1* y *TtheMTT3*) (Tabla 34). Puesto que aún no disponemos de las regiones 5'UTR de otros genes MT de otras especies de *Tetrahymena*, desconocemos si presentan o no el motivo MTCM1.

Muchas de las copias de este motivo incluyen la secuencia 5'TGANTCA3' (subrayado en el motivo MTCM1 o sombreado en Tabla 34), similar al sitio de unión del factor de transcripción AP-1 (de la familia de factores de transcripción de tipo bZIP) (Karin *et al.* 1997; Shaulian y Karin 2002). Por tanto, podría ser que un factor de transcripción similar a AP-1 participase en la regulación de la expresión de las MTs de la subfamilia 7a de *Tetrahymena*. En *S. cerevisiae*, un factor de transcripción de tipo AP-1 (YAP-1) está implicado en la respuesta a estrés oxidativo y resistencia a metales, de manera que mutantes defectivos en el gen que codifica el factor de transcripción YAP-1 son hipersensibles a la presencia de Cd en el medio (Wu *et al.* 1993).

La región 5'UTR de *TtheMTT5* contiene una duplicación en tandem de 416 pb (96 % de homología entre las dos copias) (Figura 23). Cada duplicación contiene seis y siete copias de MTCM1 respectivamente. La presencia de la duplicación en el promotor de *TtheMTT5* (que contiene en total trece copias del motivo MTCM1) (Tabla 34) podría estar relacionada con el mayor nivel de inducción de este gen respecto a *TtheMTT1* y *TtheMTT3* ante las mismas condiciones de estrés (Figura 21). Mediante el análisis de genotecas de expresión de cultivos de *T.*

Secuencia MTCM1	Scaffold	Posición	Gen más próximo	Proteína
ATGTGAATCAATTAAT	8254373	445472	<i>TtheMTT1</i>	MTT1
TTGTGATTCTTGAAT	8254373	445568	<i>TtheMTT1</i>	MTT1
GATTGACTCATGATT	8254373	445637	<i>TtheMTT1</i>	MTT1
GATTGACTCATGATT	8254373	445654	<i>TtheMTT1</i>	MTT1
ATGTGATTCTTGAAT	8254373	445706	<i>TtheMTT1</i>	MTT1
ACGTGATTCAACGATT	8254373	445771	<i>TtheMTT1</i>	MTT1
ATGTGATTCTTGAAT	8254373	447793	<i>TtheMTT3</i>	MTT3
GACTAAATCAAGAGT	8254373	447875	<i>TtheMTT3</i>	MTT3
GTGTGATTCTTGAAT	8254577	37193	<i>TtheMTT5</i>	MTT5
ATGTGATTCTTGAAT	8254577	37257	<i>TtheMTT5</i>	MTT5
ATGTGAATCATGAGT	8254577	37286	<i>TtheMTT5</i>	MTT5
GTGTGAATCATGAGT	8254577	37392	<i>TtheMTT5</i>	MTT5
GAGTGAATCATGAGT	8254577	37446	<i>TtheMTT5</i>	MTT5
GTGTGAATCATGAGG	8254577	37498	<i>TtheMTT5</i>	MTT5
GTGTGAATCATGAGT	8254577	37554	<i>TtheMTT5</i>	MTT5
ATGTGATTCTTGAAT	8254577	37703	<i>TtheMTT5</i>	MTT5
TAGTCACTCATGAAT	8254577	37708	<i>TtheMTT5</i>	MTT5
GTGTGAATCATGAGT	8254577	37809	<i>TtheMTT5</i>	MTT5
GAGTGAATCATGAGT	8254577	37863	<i>TtheMTT5</i>	MTT5
GTGTGAATCATGAGG	8254577	37912	<i>TtheMTT5</i>	MTT5
GTGTGAATCATGAGT	8254577	37968	<i>TtheMTT5</i>	MTT5
ATGTGATTCTTGAAT	8254379	304703	28.m00251	Hipotética
TTGTGATTCTTGAAT	8254448	69882	165.m00075	Similar a rodopsina
ATGTGAATCAATTAAT	8254487	83242	63.m00169	Hipotética
GATTGACTCATGATT	8254819	1505496	2.m02410	Síntesis de cobalamina
ATGTGATTCTTGAAT	AJ005080	-456	<i>TpyrMT-1</i>	MT-1
AAGTGAATCTTGAAT	AJ005080	-389	<i>TpyrMT-1</i>	MT-1
TAGTGAATCTTGAAT	AJ005080	-310	<i>TpyrMT-1</i>	MT-1
AAGTGAATCTTGAAT	AJ005080	-234	<i>TpyrMT-1</i>	MT-1
AAGTGAATCTTGGAT	AJ005080	-160	<i>TpyrMT-1</i>	MT-1

Tabla 34. Copias del motivo MTCM1 encontradas en el genoma macronuclear secuenciado de *T. thermophila* y en la región 5'UTR del gen *MT-1* de *T. pyriformis* (*TpyrMT-1*). Todas las secuencias de los motivos MTCM1 se muestran en la misma orientación. Se han destacado los nucleótidos TCA y TGA para facilitar la comparación con el sitio de unión de un posible factor de transcripción (de tipo bZIP) similar a AP-1 (TGANTCA).

thermophila expuestos a metales pesados (Cd y As) se ha observado que *TtheMTT5* es el gen codificante para una Cd-MT que más se expresa, seguido de *TtheMTT1* y finalmente *TtheMTT3* (Campos *et al.* 2007). Según los ensayos de cuantificación de actividad luciferasa de los biosensores construidos en este trabajo (Figura 59), el gen *lucFF* se expresa a mayores niveles cuando se encuentra bajo control del promotor del gen *TtheMTT5* que cuando está bajo el control del promotor de *TtheMTT1* (ver también Figura 63). Curiosamente, el ranking de inducción relativa *TtheMTT5*>>*TtheMTT1*>*TtheMTT3* observado por distintas metodologías (RT-PCRq, análisis de genotecas de expresión o construcciones con diferentes promotores) se corresponde con el número de motivos MTCM1 presentes en el promotor de cada Cd-MT, respectivamente (P_{MTT5} :13 copias >> P_{MTT1} :6 copias > P_{MTT3} :2 copias). Esto podría estar indicándonos la importancia del motivo MTCM1 en la respuesta de las Cd-MTs de *T. thermophila* a la presencia de metales u otros agentes estresantes.

En la región 5'UTR de *TtheMTT5* el motivo MTCM1 se repite con una periodicidad de 53 pb, lo que sugiere que se hayan producido duplicaciones en tandem del segmento de 53 pb. La secuencia mejor conservada dentro de cada segmento es el motivo MTCM1, lo que indica que este motivo debe desempeñar alguna función. Cada segmento de 53 pb presenta mayor homología con el resto de segmentos localizados en su misma región de 416 pb, que con

AATATTAAATTAGTATTAATCTGTTTATGATCAATATTTGCTATTTTTTAATT

TTCAAATTATGATTTAATTACTAATAATTCACCTCACCCTTAAAATGATTGT
 GATAAAGAGTCAAAATATACCATGATATAATTCACTCACCCTTAAAATGATTA
 TAATAAGAATATAAAAATACTCATGATTCACACAACATAAATAATGAATG
 CTTTTAAAGTAAAGTGTAATCCCTCATGATTCACACAACATAAATAAATAA
 TATCAAATTGAATATT---TACTCATGATTCACCAACATAAAGTAAGAA
 ATGCTACAAATTTGAATTAATACTCATGATTCACACAAGATTTCAAATATAT
 TTAATCTTTATCAAAGATACTCATCAAGTACGCAATAAATAAATAAATAA
 GCCTTTAACATAAAGTAGTCACTCATGATTCACATAAATAAATAA

TTCAAATTATGATTTAATTACTAATAATTCACCTCACCCTTAAAATGATTGT
 GATAAGAGTCAAAATATACCATGATATAATTCACTCACCCTTAAAATGATTA
 TAATAAGAATATAAAAATACTCATGATTCACACAACATAAATAATGAATG
 CTTTTAAAGTAAAGTGTAATCCCTCATGATTCACACAACATAAATAAATAA
 TATCAAATTGAATATTATTTACTCATGATTCACCAACATAAAGTAAGAA
 ATGCTACAAATTTGAATTAATACTCATGATTCACACAAGATTTCAAATATAT
 TTAATCTTTATCAAAGATACTCATCAAGTACGCAATAAATAAATAAATAA
 GCCTTTAACATAAAGTAGTCACTCATGATTCACATAAATAAATAA

ATTTATGTGATTCATGAGTCTAGCTTTAGTCAATAGTCACCAATTATATTTT
 TCATGAAAAAATAAGTGTGATTCCTGAATACAATCATGAGTTCACCATTTAA
 ACATATATTTAAATACTCAAATATTTTTTATAAAAACAGAAACAGATAAAAT
 AAAAAATAGTTGTAGTATACTAATAATCAATATAATATATCAGATTAAAAATATG

Figura 72. Estructura de la secuencia 5'UTR del gen *MTT5* de *T. thermophila*. Las dos repeticiones en tandem de 416 pb aparecen separadas por un espacio. El motivo MTCM1 aparece destacado en gris. Las versiones de MTCM1 cuya secuencia es distinta a la consenso aparecen subrayadas. Las sustituciones de nucleótidos entre las dos duplicaciones de 416 pb aparecen destacadas con un recuadro. El codon de inicio ATG aparece subrayado también. En amarillo (TGA) y azul (TCA) se indican los nucleótidos comunes al sitio de unión de AP-1.

los segmentos pertenecientes a la otra región duplicada de 416 pb. Por lo tanto, parece que primero tuvieron lugar las sucesivas (ocho) duplicaciones y diversificación del segmento de 53 pb (cada uno contiene un motivo MTCM1), y posteriormente, se produjo la duplicación en tandem de la región de 416 pb que comprende los ocho segmentos de 53 pb (Figura 72).

Otros hechos sugieren que este motivo tenga un significado biológico/funcional importante dentro de la región promotora de *TtheMTT5* y probablemente en las otras Cd-MTs de *T. thermophila*. En primer lugar, la secuencia del motivo MTCM1 se conserva en dos especies de *Tetrahymena* relacionadas (*T. thermophila* y *T. pyriformis*) (Tabla 34). En segundo lugar, tras explorar en todo el genoma macronuclear de *T. thermophila*, este motivo sólo aparece en cuatro hipotéticas regiones promotoras de cuatro genes distintos (Tabla 34); dos genes que codifican proteínas hipotéticas (no hay los correspondientes ortólogos en bancos de secuencias), un gen que codifica para una proteína similar a rodopsina, y otro que codifica una enzima implicada en la biosíntesis de la cobalamina (vitamina B₁₂) (Díaz *et al.* 2007).

La rodopsina es una proteína transmembrana involucrada en la fototransducción (pigmento visual) tanto en mamíferos como en microorganismos (bacterio-rodopsinas). Tiene una parte proteica (opsina) y otra no proteica derivada de la vitamina A (11-cis-retinal), que actúa como cromóforo fotoreactivo. Cuando un fotón incide sobre este sensor externo, el cromóforo

se isomeriza, lo que conlleva un cambio conformacional de la proteína (opsina), que a su vez activa una proteína G asociada (transductor de señal) que conecta con una cascada de segundos mensajeros. La rodopsina pertenece a una superfamilia de receptores de membrana con características estructurales muy similares entre ellas que pueden reconocer fotones, cationes divalentes, drogas, hormonas y otras diversas moléculas. En el ciliado *T. thermophila*, esta proteína similar a rodopsina, podría actuar como receptor de luz y de cationes divalentes (como el Cd^{2+}), en cualquier caso podría detectar tanto un exceso de luz que puede originar fotooxidación (estrés oxidativo) como la presencia en el medio de Cd^{2+} u otros cationes tóxicos. La proteína G (que une GTP) activa la adenilato ciclasa, que origina AMPc (segundo mensajero) a partir de ATP. El AMPc puede activar una proteinquinasa (AMPK) que a su vez puede activar MAPKs (sistema de transducción de señal -por una fosforilación secuencial- que responde a diversos agentes estresantes ambientales) (Valko *et al.* 2005). Dentro de este sistema existe la denominada quinasa c-jun N-terminal (JNK), que puede activar el factor de transcripción AP1 (Valko *et al.* 2005). Un factor de transcripción similar a AP-1 puede reconocer los motivos MTCM1 de los promotores de los genes codificantes de MTs, la proteína similar a rodopsina y la enzima involucrada en la biosíntesis de cobalamina. De este modo se incrementarían los niveles basales de MTs que pueden bloquear la presencia de Cd^{2+} o minimizar el estrés oxidativo, los niveles de la proteína similar a rodopsina (incrementando la recepción celular a estos elementos), y la enzima involucrada en la biosíntesis de cobalamina. La cobalamina (vitamina B_{12}) es un complejo hexacoordinado de Co (cobalto), siendo una de las pocas moléculas biológicas que presenta este metal de transición. La vitamina B_{12} interviene como cofactor (como la B_6 o la B_9) en el paso de conversión homocisteína en cisteína (en la ruta biosintética de la Cys), por lo que un incremento de este cofactor facilita un incremento en la biosíntesis de Cys, necesaria para biosíntesis de MTs (proteínas ricas en Cys). Según esta hipótesis, los tres tipos de genes con motivos MTCM1 en sus promotores podrían estar interconectados con el fin de contrarrestar la presencia de cationes tóxicos u otros agentes dañinos para la célula, potenciando la presencia de MTs en el citoplasma y la recepción celular a los agentes tóxicos. En la Figura 73 se muestra un esquema de la hipótesis que proponemos, hipótesis que habrá que dilucidar en un próximo futuro.

En una genoteca de expresión (tras tratamiento con Cd durante 3h) del ciliado *T. thermophila* realizada en nuestro laboratorio (datos aún no publicados), entre muchos otros genes (incluyendo los que codifican las MTs) hemos encontrado MAPKs (serina/treonina quinasas) y la enzima cistationa- γ -liasa (C γ L), enzima implicada en la rotura de la cistationa (originada por la condensación de la homocisteína + serina) liberando Cys. Es ésta la enzima que requiere como grupo prostético moléculas del grupo de la vitamina B. Estos datos podrían apoyar (al menos en parte) el modelo hipotético representado en la Figura 73.

Parece por tanto que este motivo podría implicar la existencia de un factor de transcripción (o varios) relativamente específico de los genes MT de *Tetrahymena* (Díaz *et al.* 2007), o relacionado con genes que podrían estar involucrados (junto con las MTs) en la respuesta a

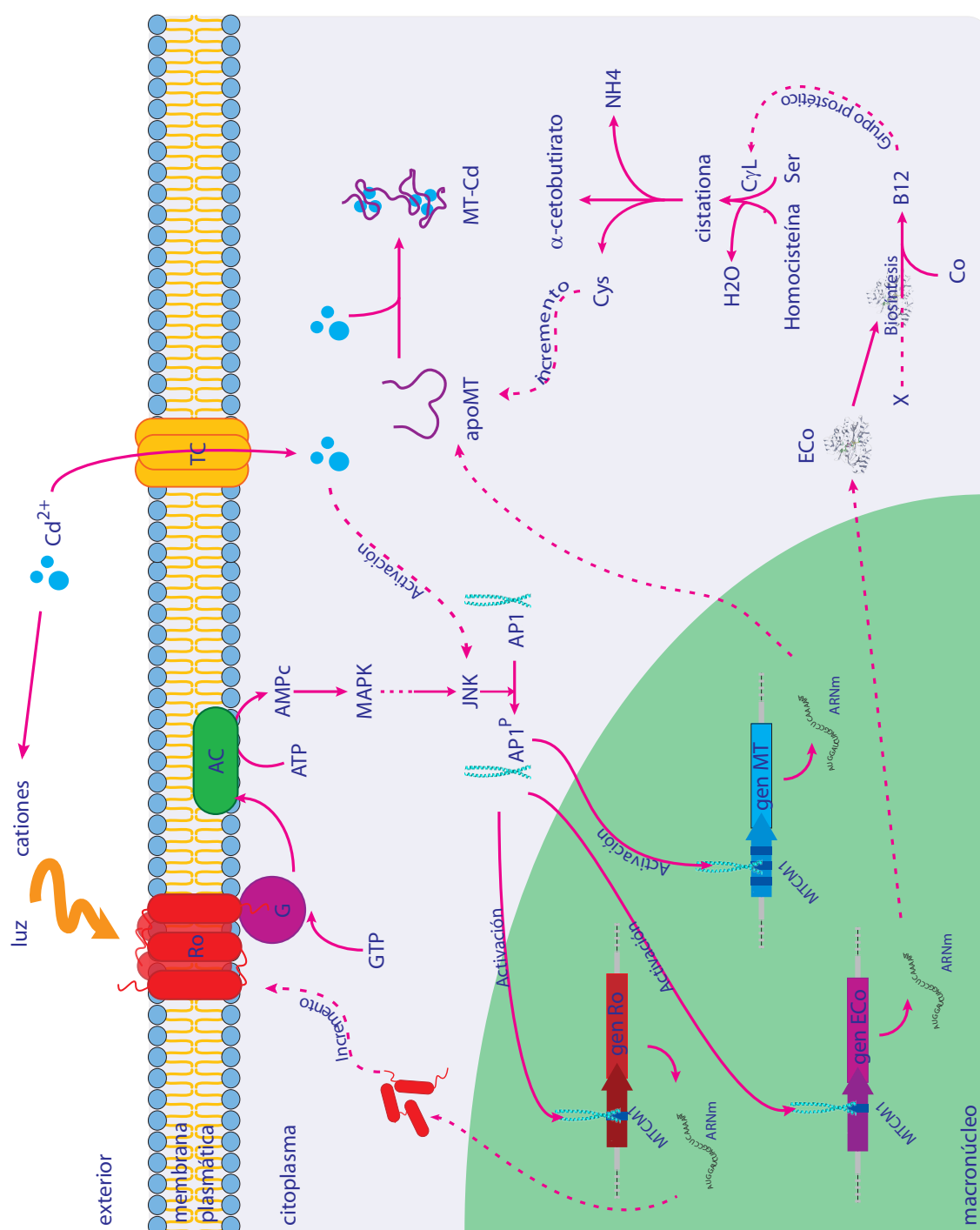


Figura 73. Modelo hipotético de interrelación en *T. thermophila* entre genes que presentan el motivo MTCM1 en su región promotora. AC: adenilato ciclasa. AP1: Factor de transcripción AP1. AP1^P: AP1 fosforilado. B₁₂: Cobalamina o vitamina B₁₂. CylL: Cistatotina-γ-lyasa (cistationasa). Co: Cobalto. Eco: enzima implicada en la biosíntesis de Cobalamina. G: proteína G. JNK: c-Jun NH2-terminal quinasa. MT: metalotioneína. Ro: Rodopsina. TC: Transportador de cationes.

estrés a metales pesados u otros agentes tóxicos.

El factor de transcripción AP-1 consiste en homodímeros o heterodímeros de proteínas de las subfamilias Jun, Fos, Maf o ATF (Shaulian y Karin 2002), pertenecientes a la familia de las proteínas de unión a ADN bZIP (*basic region-leucine zipper*) (Hurst 1995). La característica de esta familia de factores de transcripción es la presencia del dominio bZIP en su secuencia aminoacídica. Este dominio está formado por una región rica en aminoácidos básicos (región básica, RB) seguida de un motivo denominado “cremallera de leucina” (*leucine zipper*, LZ) compuesto por cuatro o más residuos de leucinas que se repiten cada seis aminoácidos (Hurst 1995) (Figura 26). Dos monómeros bZIP dimerizan mediante sus dominios LZ, formando una estructura de tipo *coiled-coil*. El dímero (homo- o heterodímero) presenta entonces la conformación adecuada para unirse al ADN a través de sus regiones básicas (Latchman 2008) (Figura 27). Aunque los motivos RB y LZ están muy conservados entre las proteínas AP-1 (y entre el resto de factores de transcripción bZIP), su secuencia amino- y carboxilo-terminal son bastante divergentes (Reddy y Mossman 2002).

En el genoma macronuclear de *T. thermophila* aparecen anotados cuatro genes codificantes para hipotéticos factores de transcripción de la familia bZIP, que hemos denominado *TthebZIP1*, *TthebZIP2*, *TthebZIP3* y *TthebZIP4*. De acuerdo con el análisis estructural de los motivos típicos bZIP que presentan estas proteínas, tres de ellas son buenos candidatos para reconocer motivos similares al sitio de unión de AP-1, y por tanto el motivo MTCM1 de los promotores de los genes Cd-MTs de *T. thermophila* (apartado A.5 de R). Las tres proteínas (*TthebZIP1*, *TthebZIP2* y *TthebZIP3*) presentan hacia su extremo C-terminal el dominio bZIP, cuya región básica tiene varios de los residuos conservados en todas las proteínas de la familia bZIP, incluidos los AP-1 (secuencia consenso N-AA--[CS]R) (Hurst 1995) (Figura 26).

Los genes *TthebZIP1*, *TthebZIP2* y *TthebZIP3* incrementan su expresión en respuesta a Cd al igual que los genes *TtheMTT1*, *TtheMTT3* y *TtheMTT5*. Los tres genes bZIP respondieron de manera diferente dependiendo de si la exposición al metal era corta (1h) o prolongada (24 h) (Figura 28). Mientras que la expresión de *TthebZIP1* resultó similar tras 1 ó 24 h de exposición a Cd (siempre con niveles superiores a los basales), los genes *TthebZIP2* y *TthebZIP3* alcanzaron mayores niveles de expresión cuando las células eran sometidas a una exposición prolongada al metal (24h > 1h) (Figura 28).

Durante la conjugación de *T. thermophila* se expresan los tres genes Cd-MTs (Figura 71, B) como ya se indicó, según los datos de expresión recogidos en la base de datos TGED. Igualmente, los tres candidatos *TthebZIP* seleccionados se expresan durante la conjugación. *TthebZIP1* tiene un pico de sobreexpresión al inicio de la conjugación (cuando se mezclan las cepas conjugantes). *TthebZIP2* tiene dos máximos de expresión durante la conjugación; uno a las 2h de la mezcla de conjugantes (meiosis micronuclear), y un segundo a las 10h (que coincide con el máximo de *TtheMTT3* y es previo a la subida de la expresión de *TtheMTT5*). Y el gen *TthebZIP3* tiene un máximo a las 6 h de iniciada la conjugación (formación del cigoto o sinca- rion), previa a los máximos de los genes Cd-MTs (8-10h) (Figura 71, B), y un segundo máximo de

expresión hacia las 12 h (previa al segundo máximo de expresión del gen *TtheMTT5*). Aunque es difícil coordinar los perfiles de expresión de estos genes y asignarles funciones durante la conjugación, es curioso detectar que algunos de estos genes se sobreexpresan en períodos o fases (la mayoría) previas a los genes Cd-MTs. Estos factores de transcripción han de activarse (por procesamiento post-traducciona, como la fosforilación entre otros) para poderse unir al promotor, por lo que requieren ser sintetizados y procesados antes de actuar. Estos datos de expresión de estos genes durante la conjugación, podrían, igualmente, apoyar la idea de que las proteínas TthebZIP podrían ser candidatas para asumir la función de regulación de la expresión (a nivel de promotor) de los genes Cd-MT de este ciliado.

Los experimentos de tipo EMSA confirmaron que *T. thermophila* presenta una o varias proteínas capaces de interaccionar con el motivo MTCM1 (Figura 29). Puesto que la unión de estas proteínas al motivo MTCM1 se produce tanto en presencia como ausencia de Zn, estas proteínas no deben presentar motivos con dedos de Zn. Según los resultados del *southwestern blotting*, al menos tres proteínas podrían interaccionar con el motivo MTCM1. Las masas moleculares obtenidas con esta técnica coinciden (en general) con las inferidas bioinformáticamente a partir de la secuencia aminoacídica de los bZIPs candidatos *TthebZIP1*, *TthebZIP2* y *TthebZIP3* (Tabla 24).

Aunque por el momento no hemos conseguido purificar la/s proteína/s que interaccionan con el motivo MTCM1, parece que una proteína de masa molecular ~ 50 kDa interacciona principalmente con este motivo (Figura 31), y podría corresponderse a la proteína que hemos denominado TthebZIP2 (58,9 kDa). La identificación de estas proteínas es un paso crucial para verificar si alguna de las proteínas candidatas es la que realmente se une a este motivo, y así entender mejor cómo es el mecanismo de regulación génica de las Cd-MTs en este ciliado.

A.10 Procesamiento alternativo del transcrito *TtheMTT5*. Potencial significado regulador

La existencia de varias moléculas de ADNc del gen *TtheMTT5*, aisladas de distintas genotecas de expresión, que mantienen o han eliminado el intrón localizado en la región 3'UTR (Figura 23), evidencia el primer caso de procesamiento alternativo de intrones en *T. thermophila*. Este fenómeno no es muy común ni en *T. thermophila* (Coyne *et al.* 2008) ni en *P. tetraurelia* (Jaillon *et al.* 2008). Se piensa que la rareza de este fenómeno en ciliados pueda estar directamente relacionada con el gran número de genes que poseen, 24.725 genes codificantes para proteínas estimados en el genoma macronuclear de *T. thermophila* (Coyne *et al.* 2008).

Hasta hoy sólo se ha descrito un caso de procesamiento alternativo dentro de la región codificante de un gen de *T. thermophila* (Smith *et al.* 2008), aunque recientemente se han detectado nuevos posibles casos (Coyne *et al.* 2008). Sin embargo, el intrón de *TtheMTT5* aparece en la región 3' UTR, lo que no implica a la región codificante del gen, por tanto se espera que el significado biológico de tal procesamiento alternativo en *TtheMTT5* sea probablemente

	Condición					
	Tratamiento con metales pesados			Conjugación ⁹		
	+ Cd o Cu	+ Cd	+ As			
Total ESTs genoteca	3176	170	108	16.188	3.301	7.282
ESTs <i>TtheMTT5</i>	37 (1,16 %) ¹	4 (2,4 %) ¹	1 (0,9 %) ¹	18 (0,11 %) ¹	2(0,06 %) ¹	13(0,18 %) ¹
ESTs <i>TtheMTT5</i> con intrón	10 (27 %) ²	0 (0 %) ²	0 (0 %) ²	3 (17 %) ²	1(50 %) ²	2(15 %) ²
ESTs <i>TtheMTT5</i> sin intrón	27 (73 %) ²	4 (100 %) ²	1 (100 %) ²	15 (83 %) ²	1(50 %) ²	11(85 %) ²
Genoteca	dbEST21626 ³	GenotecaCd ⁴	GenotecaAs ⁵	dbEST16894 ⁶	dbEST19265 ⁷	dbEST21627 ⁸
Referencia	(Garg et al. 2004)	(Campos et al. no publicado)	(Coyne et al. 2006)	(Coyne et al. 2007)	(Coyne et al. 2008)	

Tabla 35. ESTs de *TtheMTT5* identificadas en diferentes genotecas de expresión. Se indica qué número de ESTs de *TtheMTT5* identificadas mantenían o habían eliminado el intrón presente en la región 3'UTR del transcrito. ¹del total de ESTs de la genoteca. ²del total de ESTs de *TtheMTT5* de la genoteca. ³Cultivos en fase exponencial de crecimiento tratados con CdCl₂ 11 nM o CuSO₄ 500 nM durante 1 h. ⁴Cepa SB1969 expuesta a Cd 45 µM durante 3 ó 24 h. ⁵Cepa SB1969 expuesta a As 100 µM durante 1 h. ⁶No hay información disponible sobre las condiciones experimentales de esta genoteca, salvo que son células de *T. thermophila* en conjugación. ⁷Cepas CU428 y B2086, células recogidas 3-6-10 h después de combinar ambas cepas. ⁸Genoteca de ADNc sintetizado a partir de ARN aislado de las cepas CU427 y CU428, las células fueron recogidas 3-6-9 y 12 h después de combinar ambas cepas. ⁹La existencia de moléculas de ARNm de *TtheMTT5* que mantienen o han eliminado el intrón ha sido también demostrada experimentalmente a partir de células conjugantes de las cepas SB1969 y SB210, a las 3-5 y 10 h de inicio de la conjugación (Díaz et al. 2007).

regulador. En *Euplotes raikovi* se ha descrito un caso de procesamiento alternativo que determina la localización de una feromona que interviene en las etapas previas a la conjugación, la cual puede estar anclada a la membrana funcionando como receptor, o puede ser liberada al medio como proteína soluble para funcionar como un quimioatrayente (Miceli et al. 1992; Luporini et al. 2005).

El análisis comparativo de las secuencias de ADNc o ESTs del gen *TtheMTT5* derivadas de diferentes genotecas de expresión, junto con resultados obtenidos en nuestro grupo, tanto de genotecas de expresión tras exposición a metales pesados (datos aún no publicados) y experimentos de RT-PCR llevados a cabo durante la conjugación de *T. thermophila* (Díaz et al. 2007), han mostrado la existencia de un procesamiento alternativo del intron 3'UTR de este gen Cd-MT (Tabla 35). En dicha tabla comparativa, podemos ver que la mayoría de las ESTs aisladas durante la conjugación mantienen el intrón, mientras que 5 ADNc aislados de genotecas de Cd o As lo eliminan, al igual que la mayoría de las ESTs (73 %) de genotecas Cd/Cu (en estas genotecas todos las ESTs están mezclados en una única lista, y los autores no diferencian entre los que provienen de tratamiento con Cd o aquellos que derivan del tratamiento con Cu).

El intrón incluye en su secuencia dos hipotéticas señales de degradación de ARNm, con lo que el procesamiento del intrón las eliminaría pudiendo influir sobre la vida media del transcrito. Además, el intrón contiene secuencias invertidas complementarias que *in silico* pueden formar horquillas alterando así la estructura secundaria del transcrito (Figura 24). La localización intracelular de ARNm es un mecanismo que permite a las células eucariotas sintetizar las proteínas cerca del lugar donde ejercen su función, y generalmente implica al citoesqueleto y la presencia de secuencias señal de localización (*zip codes*) situadas dentro de la región 3'UTR del transcrito. Por ejemplo, la localización perinuclear del ARNm de la isoforma MT-1 de rata está determinada por las repeticiones CACC y la estructura secundaria de la región 3'UTR del transcrito (Nury et al. 2005). Se ha demostrado que la eliminación o mutación de estas señales altera la localización de los transcritos (Chabanon et al. 2004).

Aunque desconocemos actualmente el significado de la eliminación o no del intrón 3'UTR del ARNm *TtheMTT5*, podemos decir que este procesamiento diferencial podría significar tanto un mecanismo de regulación de su localización intracelular, como afectar a la vida media de los transcritos *TtheMTT5*, y por lo tanto afectar a la cantidad total de proteína obtenida.

A.11 Localización subcelular de las proteínas MTT1 y MTT5 de *T. thermophila*: Estudio *in vivo* y ultraestructural de cepas que sobreexpresan MTs y cepas control bajo el estrés causado por Cd

La finalidad del estudio ultraestructural por microscopía electrónica de transmisión era la posible localización de estructuras en donde se acumularan complejos metal-MT, detectables por su mayor osmiofilia. Los resultados de este análisis han mostrado que las células expuestas al metal (Cd) durante 2 horas presentaron una mayor y significativa vacuolización del citoplasma respecto al cultivo control no tratado (Figura 33, A y B). En algunos casos varias vacuolas se fusionan produciendo una gran vacuola que ocupa casi todo el citoplasma. La vacuolización del citoplasma parece ser un fenómeno común en células expuestas a metales pesados. Los metales inducen la generación de ROS en la célula que afectan a la integridad de la membrana, alterando su permeabilidad y el equilibrio osmótico celular (Valko *et al.* 2005). La vacuolización del citoplasma inducida por metales se ha observado también en microalgas (Visviki y Rachlin 1994; Nassiri *et al.* 1997) y en diversas especies de ciliados incluido el género *Tetrahymena* (Dunlop y Chapman 1981; Pyne *et al.* 1983; Coppellotti 1994; Piccinni y Albergoni 1996; Martín-González *et al.* 2006). Por el contrario, este fenómeno de vacuolización no se observó en la cepa GFPMTT5, incluso tras la exposición a una mayor concentración de Cd, o un tratamiento más prolongado (24h). La ausencia de vacuolización inducida por el Cd en esta cepa se debe a su mayor resistencia a la presencia del metal, como se ha visto en otros apartados de este trabajo. La cepa GFPMTT5 sobreexpresa la proteína de fusión GFP::MTT5, por lo que la cantidad total de *TtheMTT5* es considerablemente superior y, por lo tanto, puede inmovilizar mayor cantidad de iones Cd^{2+} , disminuyendo el efecto citotóxico de esa concentración de Cd.

Junto a un gran número de vacuolas, el citoplasma de la cepa SB1969 (tratada con Cd) presenta un gran número de estructuras membranosas (Figura 34). Estructuras similares han sido descritas en varias especies de microalgas (Visviki y Rachlin 1994; Nassiri *et al.* 1997) y ciliados (Martín-González *et al.* 2005) expuestos a diferentes metales. En *T. pyriformis* se ha observado un fenómeno similar en células que han sido expuestas a sales de oro o bismuto (Nilsson 1996; Nilsson 1997). En algunos casos, se ha descrito la existencia de estas estructuras membranosas en el interior de vacuolas que contienen además depósitos irregulares de material osmiofílico, que podrían ser acúmulos de metal pesado inmovilizado (Nilsson 1996; Nilsson 1997; Martín-González *et al.* 2005). Sin embargo, en ambas cepas de *T. thermophila* (SB1969 y

GFPMTT5 expuestas a Cd) no se observó acumulación de material altamente osmófilo en el interior de compartimentos celulares o en el citoplasma de ambos tipos de cepas.

De los resultados obtenidos por microscopía electrónica se infiere que al menos en *T. thermophila* el Cd no se acumula en vacuolas en las condiciones experimentales ensayadas (exposición durante 2 ó 24 horas con 0,9 μ M de Cd en tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8). Estos resultados coinciden con el hecho de que las proteínas de fusión GFP::MTT1 y GFP::MTT5 se localizan por todo el citoplasma de la célula, incluso tras 24 horas de exposición al metal (Figura 32).

Las proteínas TtheMTT1 y TtheMTT5 fusionadas a GFP continúan siendo funcionales, como se demuestra por el aumento de resistencia a Cd de la cepa GFPMTT5 (apartado C.2 de R), por lo que parece que la GFP no debe afectar al correcto plegamiento y función de TtheMTT1 y TtheMTT5. Por tanto, la localización de las proteínas de fusión GFP::MTT1 y GFP::MTT5 debería ser similar a la de las proteínas nativas TtheMTT1 y TtheMTT5. Por otro lado, debido a los altos niveles de expresión de las proteínas de fusión GFP::MTT1 o GFP::MTT5, esta mayor cantidad de MTs en el citoplasma podría enmascarar la posible localización o acumulación de los complejos metal-MTs, pero esto no parece que sea así por los resultados observados por microscopía electrónica. Un estudio adicional, que podría confirmar o no estas observaciones, podría llevarse a cabo con anticuerpos frente a cada tipo de Cd-MT.

B. ESTUDIO DE LA PSEUDOFITOQUELATÍN SINTASA DE *Tetrahymena thermophila*

B.1 El gen *TtΨPCS* codifica para una putativa pseudofitoquelatín sintasa en *T. thermophila*, cuya expresión se induce únicamente en respuesta a Cd

El principal mecanismo de detoxificación de metales en ciliados es la bioacumulación (Gutiérrez *et al.* 2008). Aunque el papel de las MTs como principales moléculas implicadas en este proceso ha sido estudiado en *Tetrahymena* desde hace dos décadas (incluyendo este trabajo), hasta ahora no se ha determinado la posible participación de otras moléculas queladoras de metal en este ciliado. Es por ello que nos propusimos analizar la existencia de fitoquelatinas (FQs) en *T. thermophila*, tras detectar en su genoma macronuclear la presencia de un gen codificante para una putativa fitoquelatín sintasa (FQS), y su posible implicación en la detoxificación de metales en este microorganismo eucariota.

Desde que a principios de este siglo se identificasen los primeros genes FQS en plantas (*AtPCS1*, *TaPCS*) (Clemens *et al.* 1999; Ha *et al.* 1999; Vatamaniuk *et al.* 1999) y otros organismos (*SpPCS* y *CePCS*) (Ha *et al.* 1999; Clemens *et al.* 2001), se han encontrado genes homólogos a FQS en organismos pertenecientes a todos los “reinos” eucariotas, poniéndose de manifiesto que la distribución de los genes FQS es realmente más amplia de lo que en un principio se

pensaba (Tabla 3). Incluso, en algunas cianobacterias y proteobacterias se ha descrito la existencia de proteínas con un dominio N-terminal similar al de las FQSs eucariotas, pero incapaces de sintetizar fitoquelatinas (Harada *et al.* 2004; Clemens 2006).

Dentro de los microorganismos eucariotas, se han descrito genes FQS en diatomeas (*Bacillariophyta*), oomicetos (*Phytophthora sojae*, *P. infestans*), hongos (*Neurospora crassa*), levaduras (*S. pombe* y *S. japonicus*), protozoos coanoflagelados (*Monosiga brevicollis*) y el hongo mucoso *Dictyostelium discoideum*. Sin embargo, hasta ahora sólo se ha demostrado que las enzimas FQS de *S. pombe* (SpPCS) y *D. discoideum* (DdPCS) son capaces de sintetizar fitoquelatinas (Clemens *et al.* 1999; Ha *et al.* 1999; Cobbett y Goldsbrough 2002). Recientemente se ha demostrado que en *S. cerevisiae* las FQs son sintetizadas por dos serín-carboxipeptidasas vacuolares (Wunschmann *et al.* 2007). Sin embargo, aunque se han detectado FQs en *N. crassa* (Kneer *et al.* 1992), *Euglena gracilis* (Aviles *et al.* 2005) y en diversas especies de diatomeas (Sca-rano y Morelli 2002), aún no se conoce cómo son sintetizadas en estos microorganismos.

Ésta es la primera vez que se describe un gen codificante de una putativa fitoquelatín sintasa en protozoos ciliados. La proteína codificada por el gen *TtΨPCS*, presenta varias características que avalan su denominación como fitoquelatín sintasa:

a) La masa molecular inferida de la proteína *TtΨPCS* (52,4 kDa) se encuentra dentro del rango de 45-55 kDa que presentan las FQSs eucariotas descritas (Cobbett y Goldsbrough 2002).

b) Un cierto nivel de conservación de su dominio N-terminal (42-58 % de identidad) con el de otras FQSs, una de las características típicas de las FQS conocidas eucariotas (Clemens 2006).

c) La presencia en el dominio N-terminal de *TtΨPCS* de los tres residuos (Cys⁷², H¹⁹⁸ y D²¹⁶ equivalentes a Cys⁵⁶, H¹⁶² y D¹⁸⁰ de *AtPCS1*) que conforman la triada catalítica de las enzimas FQS (Rea *et al.* 2004), que además mantienen una posición conservada con el resto de secuencias FQS (Figura 41).

d) Según la estructura 3D inferida de la secuencia aminoacídica de *TtΨPCS* (datos no mostrados) esta proteína se identifica como una enzima perteneciente a la familia de las FQS o la superfamilia de las cisteín-proteinasa (100 % precisión estimada y una probabilidad de que la estructura inferida se deba al azar de 3×10^{-28} (valor E).

e) La organización intrón/exón es similar a la de *AtPCS1*. Aunque los sitios donadores y aceptores del procesamiento de los intrones de *TtΨPCS* no se ajustan a las secuencias consenso de eucariotas (GT-AG), los intrones son eliminados tras la transcripción, como se ha comprobado mediante el alineamiento de la secuencia genómica y el ADNc correspondiente de *TtΨPCS* (datos no mostrados). Curiosamente, estos tres intrones están localizados en una posición similar a los de *AtPCS1*, pero presentan una localización diferente a los de la otra putativa FQS de ciliado (*P. tetraurelia*) (*PtPCS*) encontrada en su genoma (Figura 41).

Sin embargo, a pesar de todas estas similitudes existen importantes diferencias entre

la secuencia aminoacídica de TtΨPCS y las FQSs eucariotas conocidas. Por ejemplo, la región N-terminal de TtΨPCS sólo presenta una (Cys⁷²) de las cinco Cys conservadas en todas las FQS que sintetizan FQs (Figura 41). Se ha demostrado que estas cinco Cys juegan un importante papel en la activación de la enzima mediante la interacción con iones metálicos. Maier *et al.* (2003) propusieron que la activación de la enzima por Cd²⁺ implicaría la interacción de los iones Cd²⁺ con los sitios de activación presentes en el dominio N-terminal, que incluyen a estas cinco Cys conservadas. Además, se conocen otros posibles sitios de unión de Cd²⁺ en el dominio C-terminal que no son esenciales para la actividad, pero que estarían implicados en la estabilidad de la enzima, una mayor actividad y posibilidad de interacción con diferentes iones metálicos (Ruotolo *et al.* 2004; Romanyuk *et al.* 2006). De las cinco Cys conservadas, se ha demostrado que sólo una (Cys⁵⁶ en AtPCS1) es indispensable para la síntesis de FQs (Rea *et al.* 2004; Tsuji *et al.* 2005). A pesar de ello, aunque TtΨPCS mantiene la Cys esencial (Figura 41), el hecho de que sólo presente una de las 5 Cys conservadas, podría ser una de las razones por las que no sea capaz de sintetizar fitoquelatinas, al igual que sucede en las FQS procariotas (Harada *et al.* 2004).

Como sucede con las FQS procariotas (con < 1% Cys), el contenido total de la proteína TtΨPCS en residuos de Cys (~ 2%) es inferior al de las FQS del resto de eucariotas (3-4 % Cys), debido a que el dominio C-terminal de TtΨPCS es muy pobre en Cys. Algo similar ocurre en la putativa FQS encontrada en el genoma macronuclear de *P. tetraurelia* (PtPCS). Mientras que el dominio C-terminal de las FQSs eucariotas descritas es rico en Cys (7-14 Cys), las putativas FQSs de ciliados presentan tan sólo 3 (TtΨPCS) y 2 (PtPCS) residuos de Cys en su dominio C-terminal (Figura 41). Aunque el dominio C-terminal no es esencial para la síntesis de FQs (Ruotolo *et al.* 2004), este dominio regula la actividad de la enzima, aumentándola, ya que promueve la unión de metales a la enzima y los pone en contacto con el dominio catalítico N-terminal. Recientemente Vestergaard *et al.* (2008) han comprobado que la eliminación de varios residuos de Cys del dominio C-terminal disminuye el número de iones (Cd²⁺) que interaccionan con la enzima. Estas Cys presentan grupos -SH libres, y la actividad catalítica de la enzima es directamente proporcional al número de grupos tiólicos presentes en la misma (Vestergaard *et al.* 2008). Se ha comprobado que otros metales además del Cd²⁺ también pueden activar las FQSs LjPCS1 y LjPCS3, que son activadas de forma distinta por diferentes iones metálicos (Ramos *et al.* 2008). Según estos autores, las diferencias en los dominios C-terminal de estas dos FQSs son las responsables de sus distintos niveles de activación por metales.

El análisis mediante RT-PCR cuantitativa ha mostrado que el gen *TtΨPCS* se sobreexpresa casi exclusivamente por una exposición corta a Cd (Figura 43). La expresión de los genes FQS tan sólo ha sido estudiada en algunas especies de plantas superiores (*Arabidopsis thaliana*, *Triticum aestivum*, *Brassica juncea*, *Allium sativum* y *Lottus japonicus*) y en el anélido *Eisenia fetida* (Clemens *et al.* 1999; Ha *et al.* 1999; Lee y Korban 2002; Heiss *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2005; Ramos *et al.* 2008). En plantas la información es limitada y a veces contradictoria. Algunos autores afirman que *AtPCS1* y *AtPCS2* se expresan constitutivamente y no están regulados trans-

cripcionalmente por Cd (Ha *et al.* 1999; Cazale y Clemens 2001), mientras que otros autores en cambio sugieren que existe una regulación transcripcional pero no postranscripcional de *AtPCS1* en respuesta a Cd (Lee y Korban 2002). Según Heiss *et al.* (2003), la expresión de genes FQS puede variar con el órgano y la especie de planta, ya que los niveles de la FQS de *B.juncea* (BjPCS) aumentan en hojas pero no en raíces, tras una exposición prolongada a Cd.

Un estudio realizado en *A. sativum*, empleando RT-PCR semi-cuantitativa, mostró que la expresión del gen FQS podría estar controlada a nivel transcripcional, tras exposición de la planta a metales, especialmente Cd (Zhang *et al.* 2005). En *L.japonicus*, se han encontrado tres transcritos FQSs distintos (*LjPCS1*, *LjPCS2* y *LjPCS3*), cuya expresión es inducida tras una exposición corta (3-6 h) a Cd, y decae hasta los niveles basales tras una exposición prolongada (>24 h) (Ramos *et al.* 2007). Parece por tanto que, dependiendo del organismo, la expresión de genes FQS puede estar regulada a nivel transcripcional y/o postranscripcional.

En *Eisenia fetida* (Brulle *et al.* 2008) se ha propuesto que la FQS esté implicada en detoxificación de bajas concentraciones de metales, mientras que las MTs actuarían frente a niveles más altos o más persistentes de metales. Resultados similares han sido mostrados para FQS y MTs de *Avicennia germinans* expuesta a Cd o Cu (González-Mendoza *et al.* 2007).

La expresión del gen *TtΨPCS* tras 1 h de exposición a Cd fue significativamente superior que la observada tras una exposición larga a Cd (24 h) (Figura 43). Al contrario de lo que se observa para los genes Cd-MTs de *T. thermophila*, que presentan unos niveles de expresión similares ya sea tras una exposición corta o larga de Cd (apartado A.4 de R) (Díaz *et al.* 2007). Además, incluso tras una exposición corta a Cd, los niveles de expresión del transcrito *TtΨPCS* son inferiores a los de los genes *TtheMTT1* y *TtheMTT5*, por lo que parece que el gen *TtΨPCS* jugaría un papel minoritario respecto a las Cd-MTs en la detoxificación de Cd en *T. thermophila*, si ésta es la función que podría supuestamente desempeñar.

B.2 La enzima *TtΨPCS* parece estar implicada en el catabolismo del GSH en lugar de la biosíntesis de fitoquelatinas

Aunque el gen *TtΨPCS* se sobreexpresa en presencia de Cd, la ausencia de FQs en *T. thermophila*, en cultivos expuestos o no al metal, cuestiona la identidad de esta enzima como una verdadera γ -glutamyl-cisteinyl-transpeptidasa o fitoquelatín sintasa (FQS).

El análisis por MS-HPLC de los extractos de células de *T. thermophila* tratadas con Cd (Figura 46) mostró la existencia de dos picos identificados como derivados de GSH sin Glu (Cys-Gly) y GSH sin Gly (γ Glu-Cys), junto con unos niveles de GSH superiores a los de células no expuestas al metal. Los mayores niveles de GSH en células expuestas a Cd respecto del control (no tratado) han sido demostrados mediante el análisis por HPLC de extractos celulares de *T. thermophila* (Figura 45). Los resultados del análisis MS-HPLC (Figura 46) parecen mostrar que, en cuanto al metabolismo del GSH en *T. thermophila* sometidas a estrés por Cd, más que la biosíntesis de FQs (las cuales no se han detectado por ninguno de los diferentes métodos

utilizados) tenga lugar la hidrólisis de GSH. La hidrólisis del GSH es la única actividad demostrada de la FQS procariota (NsPCS) de *Nostoc* sp. (Harada *et al.* 2004), aunque solamente *in vitro* presenta una muy débil actividad fitoquelatín-sintasa (Tsuji *et al.* 2004). Además, una actividad carboxipeptidasa sobre los conjugados de GSH, dependiente de Cd, ha sido detectada en las enzimas AtPCS1 y ScPCS (Beck *et al.* 2003; Blum *et al.* 2007)

Según Blue *et al.* (2007), esta actividad hidrolítica es la función más antigua de la FQS, residiendo exclusivamente en el dominio N-terminal de la enzima, mientras que el dominio C-terminal fue adquirido más tarde en la evolución, proporcionando capacidad reguladora y contribuyendo a la resistencia celular frente a metales. El dominio C-terminal no está presente en la NsPCS, ni en ninguna de las FQSs procariotas, y aunque sí está presente en TtΨPCS, su contenido en residuos de Cys es aproximadamente 3 veces menor que el de las FQSs estándar (Figura 41, Tabla 25).

El mecanismo catalítico de síntesis de fitoquelatinas por la FQS es un mecanismo de sustitución enzimática, la enzima presenta dos sitios de unión y acilación de los sustratos (Vatamaniuk *et al.* 2000). La Cys⁵⁶ del centro catalítico representa el primer sitio de acilación, mientras que el segundo sitio probablemente se localiza en el dominio C-terminal (Clemens 2006; Rea 2006). En primer lugar el GSH donador se une a la Cys⁵⁶, formándose el intermediario γGlu-Cys acil-enzima y se libera la Gly del GSH. Estos dos pasos son independientes de la presencia de metal en el medio (Figura 4). En presencia de Cd²⁺ (u otro metal), se da también la unión de la molécula aceptora (GSH o FQn) al segundo sitio de acilación de la enzima (Rea *et al.* 2004). Se produce entonces el ataque nucleofílico de la molécula aceptora sobre el intermediario γGlu-Cys acil-enzima, resultando así la reacción de transpeptidación que comporta la síntesis de fitoquelatinas (FQ₂ o FQ_{n+1}). En el caso de procariotas (NsPCS), la molécula aceptora es una molécula de H₂O, por lo que el resultado final es la hidrólisis del GSH en γGlu-Cys + Gly.

Una de las posibles razones de la incapacidad de TtΨPCS para sintetizar FQs podría ser el escaso contenido en residuos de Cys de su dominio C-terminal, así el sitio de unión/segundo sitio de acilación de la molécula aceptora podría no estar presente, al igual que sucede en NsPCS. Puesto que el dominio N-terminal aislado de AtPCS1 es suficiente para la catálisis y síntesis de FQs (Ruotolo *et al.* 2004), deben existir además características únicas en este dominio que no aparecen en los dominios N-terminal de TtΨPCS y NsPCS. Otros autores (Vivares *et al.* 2005) han propuesto que la incapacidad de NsPCS de sintetizar FQs podría deberse a la orientación de regiones específicas de la proteína, y determinados residuos cercanos al centro activo.

Estas observaciones, junto con la ausencia de FQs detectables en extractos celulares de *T. thermophila* expuestas a Cd, sugiere que al igual que ocurre con NsPCS, TtΨPCS sea una FQS sin capacidad de sintetizar FQs, e implicada en otros procesos de conversión del GSH, incluyendo quizás la degradación del GSH o de conjugados de GSH. En plantas y animales la primera etapa en la degradación de los conjugados de GSH implica la actuación de una γ-glutamilttransferasa (γ-GT) (Figura 74). La detección de derivados de GSH (Gys-Gly, γGlu-Cys) en

[illegible]

169

C. *Tetrahymena* COMO BIOSENSOR CELULAR DE METALES PESADOS

C.1 Los promotores de *TtheMTT1* y *TtheMTT5* como herramientas moleculares para la construcción de biosensores celulares de metales pesados

La contaminación por metales constituye uno de los problemas ambientales actuales más importantes. Incluso a bajas concentraciones los metales representan una seria amenaza para la salud humana y el ecosistema, ya que estos contaminantes inorgánicos no son biodegradables y experimentan un proceso de bioacumulación a lo largo de la cadena trófica (Seebaugh *et al.* 2005; Gutiérrez *et al.* 2008).

Demostrada la ausencia de fitoquelatinas en *T. thermophila* (apartado anterior), el principal mecanismo de resistencia a metales presente en este ciliado implica la inmovilización de los iones metálicos en el citoplasma por metalotioneínas y/o probablemente GSH, ya que ambas moléculas experimentan una rápida biosíntesis inducida en respuesta a la presencia de metales y otras condiciones de estrés ambiental (Dondero *et al.* 2004; Díaz *et al.* 2007). Diferentes estudios han demostrado que en *Tetrahymena*, como en otros organismos, la transcripción de los genes MT se incrementa considerablemente tras la exposición de la célula a distintos metales pesados (Dondero *et al.* 2004; Fu y Miao 2006; Díaz *et al.* 2007; Santovito *et al.* 2007; Amaro *et al.* 2008; Guo *et al.* 2008)(apartado A4 de R).

La inducción de la expresión de genes MT es un buen bioindicador de la posible existencia de contaminación ambiental por metales (Newman y Unger 2003). La inducción de la síntesis de MTs por metales se ha comprobado en una gran multitud de organismos distintos, demostrando el potencial de las MTs como biomarcadores de contaminación. (Dallinger *et al.* 2000; Amiard *et al.* 2006). De hecho, las MTs forman parte del conjunto de biomarcadores reconocidos por la Unión Europea empleados en los programas de evaluación y seguimiento ambiental (BEQUALM) (Mathiessen 2000). Estas proteínas, además, son adecuadas para la construcción de biosensores moleculares para metales, ya hay algunos biosensores desarrollados basados en MTs (Corbisier *et al.* 1999). Las MTs de ciliados, dado su mayor tamaño y número de Cys, representan excelentes candidatos para la construcción de biosensores moleculares para metales pesados (Gutiérrez *et al.* 2006).

Se han empleado diversas metodologías para monitorizar MTs en humanos (Ganguly *et al.* 1996). Sin embargo, una excelente alternativa (más rápida y económica) a la detección de transcritos o proteínas MT es el empleo de organismos transgénicos en los que se ha fusionado un gen reportero fácilmente detectable al promotor de un gen MT que responde a la presencia del metal. Este es el principio que sigue la mayoría de los biosensores celulares para metales pesados, acoplar un gen reportero al promotor de un gen que se sabe es inducible por la presencia de metal (Magrisso *et al.* 2008).

En los últimos años los promotores de los genes MTs de *Tetrahymena* *TtheMTT1* o *TtheMTT2* se han revelado como excelentes herramientas biotecnológicas para la expresión hete-

róloga de proteínas en este ciliado, dada su rápida respuesta y elevado nivel de expresión a la presencia de bajas concentraciones de metal (Shang *et al.* 2002; Boldrin *et al.* 2008). Como ya se ha comprobado en este trabajo (apartado A.4.1 de R), el promotor del gen *TtheMTT5* es “más fuerte” que el de *TtheMTT1*, previamente caracterizado como un promotor rápido y fuertemente inducible por la presencia de Cd (Shang *et al.* 2002). Por ello, aprovechando la gran capacidad de respuesta de los promotores de *MTT1* y *MTT5* de *T. thermophila* (inferida a partir del estudio comparativo de expresión de *TtheMTT1* y *TtheMTT5*, apartado A.4.1 de R), hemos construido dos tipos de biosensores celulares empleando distintos genes reporteros (*gfp* y *lucFF*) bajo el control de estos promotores.

C.2 Ventajas de los biosensores *MTT1Luc* y *MTT5Luc* sobre el biosensor *GFPMTT5*

El uso de *gfp* como gen reportero tiene la ventaja de que la señal puede ser detectada *in vivo* y directamente, sin necesidad de añadir enzimas o sustratos exógenos, cofactores o ATP. Éste fue el gen elegido para la construcción de las cepas *GFPMTT1* y *GFPMTT5* que expresan la proteína GFP bajo el control del promotor de *TtheMTT1*. Además, el ORF de la proteína GFP se fusionó al ORF de *TtheMTT1* o *TtheMTT5*, para que el biosensor presentase mayor resistencia al metal, y fuese por tanto capaz de trabajar en un rango más amplio de concentración.

Tras la exposición de cualquiera de las dos cepas al Cd, la fluorescencia emitida en respuesta al metal es fácilmente detectable mediante microscopía de fluorescencia (Figura 48), lo que hace que el bioensayo sea relativamente sencillo. Además, la señal de fluorescencia de los biosensores puede ser cuantificada mediante citometría de flujo, que permite evaluar de forma simultánea la mortalidad/viabilidad del biosensor, añadiendo yoduro de propidio. Las cepas *GFPMTT1* y *GFPMTT5* tienen el mismo elemento sensor (P_{MTT1}), únicamente se diferencian en el tipo de MT fusionada a la GFP (*TtheMTT1* o *TtheMTT5*). Por ello sólo se cuantificó la respuesta de la cepa *GFPMTT5* frente a distintas concentraciones de Cd mediante citometría de flujo (Figura 49).

Las construcciones reporteras presentan un cierto nivel de expresión basal (Figura 49), puesto que como se ha comprobado los genes MT de *Tetrahymena* presentan cierto grado de expresión constitutiva (Díaz *et al.* 2007). Cuando el biosensor *GFPMTT5* era expuesto a $8,90 \times 10^{-8}$ M de Cd, en alguna de las repeticiones del experimento la fluorescencia no era significativamente distinta a la basal. Para concentraciones de Cd superiores, la fluorescencia del biosensor era significativamente muy superior a la expresión basal, por consiguiente se estableció que el biosensor *GFPMTT5* puede detectar la presencia de metal (referido al Cd) hasta una concentración mínima de $4,45 \times 10^{-7}$ M (Figura 49, A), siendo este el límite de sensibilidad menor para este metal.

La cepa *GFPMTT5* representa un buen sistema para la detección de Cd, ya que incluso concentraciones del metal del rango de $4,45 \times 10^{-7} - 2,67 \times 10^{-6}$ M, que no tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento y sobre la viabilidad celular, provocan un aumento significativo

de la expresión de la construcción GFP::MTT5. Además, puesto que esta cepa presenta una considerable mayor resistencia al Cd ($CL_{50} > 15 \mu M$) que la cepa salvaje SB1969 ($CL_{50} = 1,73 \mu M$) (Gallego *et al.* 2007), como biosensor es capaz de detectar la presencia de Cd incluso a unas concentraciones que son letales para la cepa salvaje.

Sin embargo el biosensor GFPMTT5 tiene ciertos inconvenientes. Por ejemplo, esta cepa no es estable a lo largo del tiempo, ya que la construcción pVGF.MTT5 no está integrada en el genoma macronuclear del ciliado, sino que es un plásmido en alto número de copias. Y aunque el número de copias es originalmente elevado, y se mantenga la presión selectiva con la droga paromomicina, con el tiempo se puede perder el plásmido. Por el contrario, los biosensores MTT1Luc y MTT5Luc son cepas estables a lo largo del tiempo, ya que la construcción reportera ($P_{MTT1}::lucFF$ ó $P_{MTT5}::lucFF$) está integrada en el locus *btu1-1* del genoma macronuclear (Figura 55).

Además de que la cepa GFPMTT5 puede perder la construcción reportera a lo largo del tiempo, este biosensor presenta otras desventajas respecto a los biosensores MTT1Luc y MTT5Luc. La proteína GFP requiere un proceso de maduración para ser fluorescente, en el que tiene lugar una serie de reacciones autocatalíticas (Tsien 1998), por ello el tiempo mínimo de exposición del biosensor a la muestra debe ser de 2 horas. En cambio, la respuesta quimioluminiscente de las cepas MTT1Luc y MTT5Luc se puede detectar tras sólo 1 hora de exposición al metal (Figura 57). Y la ventaja más importante es que los biosensores MTT1Luc y MTT5Luc presentan una mayor sensibilidad en el nivel de detección de Cd (5-25 nM Cd) que aquella presentada por GFPMTT5 (445 nM Cd), pudiendo así detectar una concentración de Cd aproximadamente 18 veces inferior a la mínima detectable por GFPMTT5. Numerosos trabajos han confirmado que los biosensores celulares basados en bioluminiscencia son más sensibles que aquellos basados en GFP (Hakkila *et al.* 2002; Stocker *et al.* 2003; van der Meer *et al.* 2004). No obstante, Kohlmeier *et al.* (2007) comprobaron que, empleando un sistema LIF-CS (espectroscopía confocal de fluorescencia inducida por láser) para cuantificar fluorescencia, su biosensor bacteriano basado en GFP presentaba una sensibilidad similar a la de los que emplean el gen *luxFF* como gen reportero (Kohlmeier *et al.* 2007). Por lo tanto, parece que, al menos en nuestro caso, el bioensayo empleando los biosensores MTT1Luc y MTT5Luc presenta mayor sensibilidad y menor coste económico que empleando los biosensores GFPMTT1 o GFPMTT5. Aunque MTT1Luc/MTT5Luc requieran la adición del sustrato de la luciferasa (D-luciferina), la cuantificación de la señal fluorescente de GFPMTT1/GFPMTT5, aunque con una sensibilidad aceptable, requiere metodologías (microscopio de fluorescencia, citometría de flujo o LIF-CS) indudablemente más costosas que un simple luminómetro.

Sin embargo, no hay que olvidar que aunque el biosensor GFPMTT5 mostró menos sensibilidad al Cd que MTT1Luc/MTT5Luc, presenta una mayor resistencia al metal. GFPMTT5 puede detectar la presencia de Cd, incluso a concentraciones letales para la cepa salvaje o los biosensores MTT1Luc/MTT5Luc. De modo que mientras la cepa salvaje SB1969 y las recombinantes MTT1Luc y MTT5Luc mueren cuando son expuestas durante 2 horas a concentracio-

nes de Cd superiores a 5 μM , la cepa GFPMTT5 presenta una mortalidad del 50 % incluso a concentraciones superiores a 10 μM de Cd (Figura 49, A). Quizás el biosensor GFPMTT5 podría utilizarse de forma complementaria a MTT1Luc/MTT5Luc cuando se contemple la posibilidad de que la muestra contenga elevadas concentraciones de metales.

Los defensores de la GFP como molécula reportera argumentan que dado que no es una enzima, no altera el metabolismo celular del biosensor. Aunque la luciferasa sí que es una enzima, sólo participa en el metabolismo celular cuando se adiciona su sustrato (D-luciferina). Por tanto, hasta que se añade la D-luciferina, la luciferasa no interviene en el metabolismo de la célula, y por tanto su situación es similar a la GFP (Tauriainen *et al.* 1999). Además, la GFP es una proteína muy estable y se acumula dentro de las células, lo que representa un inconveniente para estudios de cinética de expresión (Andersen *et al.* 1998).

Aunque los biosensores GFPMTT1/GFPMTT5 han sido útiles en la investigación básica sobre las MTs y podrían, igualmente, ser utilizados como biosensores celulares para metales, debido a las ventajas que presentan los biosensores MTT1Luc/MTT5Luc se eligieron éstos para su utilización en numerosos bioensayos, tanto con muestras artificiales como muestras naturales, y su validación como sistemas de detección rápida de metales pesados.

C.3 Caracterización de la respuesta de los biosensores MTT1Luc y MTT5Luc

C.3.1 Optimización de las condiciones del bioensayo *turn on*

Además de las características genéticas del propio biosensor celular, existen varios factores que pueden afectar a la expresión de la molécula reportera. Los más importantes son el medio y el tiempo de exposición a la muestra, la fase de crecimiento, y el número de células expuestas a la muestra (Liao y Ou 2005).

Para evaluar la respuesta de los biosensores a las distintas situaciones de estrés se estableció un bioensayo de tipo *turn on* (Figura 56), cuyas condiciones fueron optimizadas para obtener la máxima respuesta en el mínimo tiempo posible.

Con respecto a la fase de crecimiento celular, se eligió la fase exponencial ($1-3 \times 10^5$ cel/ml), ya que el patrón de inducción de los genes *TtheMTT1* y *TtheMTT5* en respuesta a metales había sido estudiado previamente en cultivos en fase exponencial de crecimiento (apartado A.4.1 de R). Además se ha descrito que la sensibilidad de *Tetrahymena* al Cd es mayor cuando se encuentra en fase exponencial que en fase estacionaria de crecimiento (Larsen 1989).

Como medio de crecimiento para *Tetrahymena* se empleó PP210 (Tabla 6). Este medio, aunque bueno para un crecimiento óptimo de este ciliado, contiene gran cantidad de hidrolizados proteicos que pueden quelar los cationes metálicos, convirtiéndolos en no bio-disponibles para la célula (Nilsson 1989). Por esta razón, el medio de exposición de las células (biosensores) al metal o a la muestra contaminada, fue el tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8 con la finalidad de que todo el metal presente en la muestra se mantuviese en forma biodisponible.

En cuanto a la temperatura de exposición del biosensor al metal se eligió 30 °C, puesto que es la temperatura a la que se cultivó *T. thermophila* para estudiar la expresión de los genes *TtheMTT1* y *TtheMTT5* en respuesta a metales (apartado A.4.1 de R). También se comprobó que la temperatura no afecta a la expresión de luciferasa bajo la acción de los promotores de los genes *TtheMTT1* o *TtheMTT5* en los biosensores (Figura 62).

A la hora de utilizar un biosensor se pretende que el bioensayo sea lo más rápido posible, por ello se evaluó la respuesta de los biosensores para metales a tiempos de exposición cortos. Según la cinética de inducción de la expresión de luciferasa en respuesta a Cd en la cepa MTT5Luc (Figura 57), el tiempo óptimo de exposición fue de 2 horas, ya que es el menor intervalo de tiempo para el que se obtienen los máximos valores de luminiscencia/actividad luciferasa. Tras 3 horas de exposición al Cd, la cantidad de luz emitida por el biosensor resultó prácticamente similar a la observada tras 2 horas. Por lo tanto, se decidió fijar el tiempo de exposición del biosensor a 2 horas, que igualmente se aplicó a los ensayos con el biosensor MTT1Luc.

El fundamento del biosensor y el bioensayo al cual se aplica se resume en la Figura 56. Solamente el metal que se encuentre en forma biodisponible activará la transcripción del gen reportero *lucFF*, vía el promotor del gen *TtheMTT1* o *TtheMTT5*, dependiendo de la cepa. La cantidad de enzima luciferasa producida se detecta añadiendo el sustrato D-luciferina y cuantificando la luz producida en la reacción mediante un luminómetro (apartado 14 de MYM).

C.3.2 La expresión de luciferasa en los biosensores MTT1Luc y MTT5Luc se puede cuantificar *in vivo* e *in vitro*

El sustrato de la enzima luciferasa (D-luciferina) solamente atraviesa la membrana citoplasmática en su forma protonada a pH 5. Por el contrario a pH 7 la molécula se encuentra cargada negativamente (debido a sus grupos carboxilo y fenol) lo que dificulta su paso a través de la membrana (van der Meer *et al.* 2004). Por ello, en la mayoría de los ensayos la actividad de la luciferasa eucariota se valora *in vitro* a partir de extractos celulares (Tauriainen *et al.* 1999; van der Meer *et al.* 2004), o incrementando la permeabilidad de la membrana añadiendo el sustrato disuelto en una solución tamponada ácida (pH 5) (Petänen y Romantschuk 2002; Barrocas 2004), o permeabilizando las células previamente a la adición de la D-luciferina (Lagido *et al.* 2001). En cualquier caso, cuando no se utilizan extractos celulares, la luz producida por la reacción bioluminiscente estará limitada por la velocidad de difusión de la D-luciferina al interior celular.

La luminiscencia de los biosensores MTT1Luc y MTT5Luc en respuesta a la presencia del metal se puede cuantificar tanto *in vivo* como *in vitro*, obteniéndose un patrón de inducción similar (Figura 58). Para la medida *in vivo* bastó con añadir el sustrato D-luciferina disuelto en la solución comercial *Luciferase Assay Reagent* (Promega) (pH 7,8), sin necesidad de permeabilizar previamente las células. Tampoco fue necesario disolver la D-luciferina en una solución ácida.

Y tras valorar la actividad luciferasa se comprobó que las células continúan perfectamente viables.

Otros eucariotas modelo como *S. cerevisiae* o *C. elegans*, se han utilizado como biosensores celulares para detectar metales y otros tóxicos, y en todos los casos se requiere un tratamiento previo de permeabilización del biosensor al sustrato D-luciferina (Hollis *et al.* 2000; Lagido *et al.* 2001). Sin embargo, y a diferencia del microorganismo eucariota *S. cerevisiae*, la ausencia de pared celular en el protozoo ciliado *T. thermophila* le confiere una gran ventaja como tipo celular eucariota para la construcción de un biosensor celular, al permitir una rápida difusión del sustrato al interior celular sin ningún tipo de procesamiento adicional, haciendo el bioensayo más rápido y sencillo.

También se cuantificó la actividad luciferasa de los biosensores permeabilizando las células, previamente a la adición de la D-luciferina, con una solución de Triton X-100 y DMSO (apartado 14.2 de MYM), como se ha descrito para una cepa transgénica de *C. elegans* (Lagido *et al.* 2001). Aunque se obtiene el mismo patrón de inducción que el observado mediante la cuantificación *in vivo* e *in vitro*, las células no continuaban viables tras la realización del bioensayo. Minutos después de la permeabilización las células comenzaban a estallar. Por lo tanto descartamos esta forma de cuantificación.

Según Wilson y Amman (2007) las características de cualquier biosensor con aplicaciones biológicas deben ser evaluadas *in vitro* (Wilson y Amman 2007). Para la caracterización de la respuesta de los biosensores, elegimos cuantificar la actividad luciferasa *in vitro* porque de este modo podíamos normalizar la medida obtenida de diferentes muestras respecto al contenido de proteína total celular, haciendo así los resultados más comparables. Además, la valoración *in vitro* se realizó empleando un kit comercial donde las condiciones de reacción están optimizadas, permitiendo una mayor sensibilidad. Por ejemplo, el kit empleado (apartado 14.1 de MYM) incorpora la coenzima A junto al sustrato D-luciferina, de modo que se consigue prolongar la emisión de luz durante al menos un minuto (Promega 2006). Además, la medida de luminiscencia se correlaciona mejor con la cantidad de enzima luciferasa presente en el interior de las células empleando el método *in vitro*, ya que cabe la posibilidad de que la membrana plasmática pueda constituir una barrera para el sustrato de la luciferasa (D-luciferina), y la luminiscencia podría por tanto depender más de la difusión de la D-luciferina a través de la membrana, que de la cantidad de la enzima presente en la célula (Tauriainen *et al.* 1999). Se podría pensar que el interior celular representa un ambiente más óptimo para que se produzca la reacción de bioluminiscencia, ya que proporciona todos los cofactores y sustratos adicionales necesarios y un entorno más constante, pero esto ya se ha conseguido con los últimos kits de detección de actividad luciferasa comerciales desarrollados. Por ejemplo, como ya se ha comentado, el kit utilizado consigue aumentar la estabilidad de la reacción de luminiscencia.

Respecto a si la variabilidad de la medida es mayor cuantificando *in vitro* que *in vivo* hay variedad de opiniones. Lagido *et al.* (2001) no encuentran correlación entre la medida *in vivo* e *in vitro* de la bioluminiscencia producida por *C. elegans* en respuesta a varias condicio-

nes de estrés (temperatura, Cu, Pb y 3,5-diclorofenol). Tauriainen *et al.* (1999) obtuvieron más variabilidad en la medida *in vitro* que en la desarrollada *in vivo* cuando aplicaron su biosensor a muestras naturales, aunque finalmente concluyen que las dos metodologías son adecuadas.

C.3.3 Los biosensores MTT1Luc y MTT5Luc responden exclusivamente a la presencia de distintos metales pesados. Cada cepa presenta un perfil de respuesta diferente

Todos los metales ensayados inducen la expresión de luciferasa a concentraciones muy por debajo de sus correspondientes CL_{50} . Esto demuestra por tanto que las cepas MTT1Luc y MTT5Luc constituyen un método sensible y eficaz para la detección metales pesados. La cantidad de luz emitida (luciferasa sintetizada) aumentó al incrementar las concentraciones de metal hasta alcanzar los niveles máximos a una concentración de metal determinada, por encima de la cual la señal comenzó a decaer a consecuencia de la citotoxicidad del metal, incluso aunque no se observase mortalidad celular. La bioluminiscencia requiere una gran inversión de energía para la célula (gastando ATP y cofactores), lo que puede representar una gran carga metabólica para las células que a su vez han reducido su actividad metabólica como consecuencia de la toxicidad del metal. Así, la célula expuesta a una determinada concentración de metal (por ejemplo 1,5 μM de Cd) puede que no posea la energía suficiente para producir una gran cantidad de luminiscencia (van der Meer *et al.* 2004).

Los biosensores MTT1Luc y MTT5Luc responden de manera diferente a los distintos metales pesados (Figura 59). La cepa MTT5Luc (Figura 59, B) presenta unos niveles de bioluminiscencia superiores (~10-60 veces los niveles basales) que la cepa MTT1Luc (~2-18 veces los niveles basales) (Figura 59, A). La cepa MTT1Luc respondió principalmente a la presencia de Cd, Zn, Cu o Hg, mientras que el tratamiento con Pb o As incrementaron débilmente la expresión de luciferasa en este biosensor. Coincidiendo con esto, el análisis comparativo de la expresión de los genes *TtheMTT1* y *TtheMTT5* en la cepa SB1969 reveló que Pb y As producen una menor inducción de la expresión de *TtheMTT1* que con Cd y Zn (apartado A.4.1 de R).

El Cd es el metal que induce un mayor incremento de la bioluminiscencia en ambos biosensores MTT1Luc y MTT5Luc. Numerosos trabajos han demostrado que el Cd es un excelente inductor de la expresión de MTs en *Tetrahymena* (apartado A.4.1 de R) (Dondero *et al.* 2004; Fu y Miao 2006; Díaz *et al.* 2007; Santovito *et al.* 2007; Amaro *et al.* 2008) y de MTs de otros organismos (Wang *et al.* 2009; Williams *et al.* 2009), al igual que el hecho de que la síntesis de MTs desempeña un papel fundamental en la defensa de la célula frente a la toxicidad del Cd (Piccinni y Albergoni 1996; Gutiérrez *et al.* 2009). De hecho, como ya se ha comentado, la mayor resistencia a Cd de la cepa GFPMTT5 ($CL_{50} > 15 \mu M$) respecto a la cepa salvaje SB1969 ($CL_{50} = 1,73 \mu M$) (Gallego *et al.* 2007), se debe a que sobreexpresa la proteína de fusión GFP::MTT5, y presenta más cantidad de *TtheMTT5* lo que puede inmovilizar más iones Cd^{2+} .

La sensibilidad de los biosensores es mayor para los metales pesados no esenciales (concentración mínima detectable 5-50 nM) que para los esenciales (0,5-2,5 μM) (Tabla 28), lo

cual es consistente con el hecho de que la CL_{50} para los metales no esenciales es menor que para los esenciales. Por ejemplo, el orden de toxicidad para *T. thermophila* tras 24 horas de exposición es $Cd > Cu > Zn$ (Gallego *et al.* 2007). Numerosos estudios han demostrado también que los metales no esenciales son tóxicos a concentraciones menores que los esenciales (Fairbrother *et al.* 2007). Puesto que la inducción de la expresión de luciferasa en MTT5Luc por los metales esenciales Cu y Zn es considerablemente menor que por Cd, Pb, y As (Figura 59), se necesitan concentraciones mayores de Cu y Zn para alcanzar los niveles de inducción similares a aquellos producidos por concentraciones bajas de Cd, Pb o As. Además de los resultados de este trabajo (Figuras 21 y 22), otros autores han comprobado que el Zn y el Cu son peores inductores de la expresión de las Cd-MTs de *Tetrahymena* respecto al Cd y al Pb (Dondero *et al.* 2004; Guo *et al.* 2008). Este hecho se ha observado también en otros organismos (Swain *et al.* 2004), y podría indicar que las proteínas TheMTT1 y TtheMTT5 sean más importantes para la detoxificación de Cd que de Cu o Zn, como se ha propuesto para Cd-MTs de otros organismos cuya expresión se induce más por Cd que por Cu o Zn (Williams *et al.* 2009).

Varios estudios (Dondero *et al.* 2004; Domenech *et al.* 2008) han mostrado la clara preferencia de las Cd-MTs de *Tetrahymena* por unir *in vitro* Cd respecto a Zn o Cu. En mamíferos (rata) se ha observado que las MTs son las proteínas sintetizadas en mayor cantidad cuando las células son expuestas a altas concentraciones de Cd. Además, del total de Cd presente en el citoplasma, el 85 % se encontraba unido a MTs, mientras que sólo el 40 % del Zn y el 45 % del Cu estaba inmovilizado por MTs (Saito *et al.* 1999).

A pesar de que los genes MTs de *Tetrahymena* se inducen en respuesta a distintas condiciones de estrés (apartado A.4.1 de R) (Dondero *et al.* 2004; Fu y Miao 2006; Guo *et al.* 2008), parece ser que en las condiciones específicas del bioensayo (apartado 14 de MYM) la expresión de la luciferasa se induce únicamente tras la exposición de los biosensores a metales pesados. Aunque agentes estresantes distintos a los metales, como pH ácido o el PQ, inducen la expresión del gen *TtheMTT5* (Figura 21), no se detectó un incremento en la luminiscencia cuando los biosensores fueron expuestos a estas condiciones de estrés (Figura 62). La disparidad en la respuesta obtenida entre los dos tipos de experimentos podría deberse a las diferentes condiciones de experimentación, que incluyen distintos tiempos de tratamiento (24h vs. 2h) y metodología (RT-PCRq vs. ensayo de actividad luciferasa) para analizar la actividad del promotor de *TtheMTT5*. Con respecto al factor pH, podría ser que el pH ácido induzca la expresión del gen *lucFF* bajo el control del promotor de *TtheMTT5* e incluso se sintetice la enzima luciferasa en el biosensor MTT5Luc. Se ha descrito que la actividad de la enzima luciferasa se inhibe a pH 5 (Barrocas 2004), tras la lisis con el tampón CCLR1x (pH 7,5) de las células incubadas en medio PP210 pH 5 o tampón Tris-HCl 0,01 M pH 5. Los extractos celulares presentaban un pH de 6 antes de la cuantificación de la actividad luciferasa presente en estos extractos, y por lo tanto, podría ser que este pH 6 inhiba en cierto grado la actividad enzimática y disminuya así la reacción de quimioluminiscencia. Esto podría igualmente explicar que en estas muestras se observasen valores similares a los basales (biosensor incubado en TrisHCl pH 6,8).

Otra posible explicación podría ser que a la región 5'UTR de *TtheMTT5* clonada en la construcción reportera $P_{MTT5}::lucFF$ le faltase un elemento regulador situado hacia el extremo 5', que participe en la activación del promotor bajo estas condiciones de estrés (distintas a exposición a metal pesado). Algo similar se ha sugerido para una cepa transgénica de *C. elegans* donde el As induce la transcripción del gen *mtl-2*, pero en cambio no induce la expresión del gen repotero *gfp* bajo control del promotor de *mtl-2* (Williams *et al.* 2009).

C.3.4 La expresión de luciferasa en los biosensores MTT1Luc y MTT5Luc coincide con la expresión de los genes macronucleares *TtheMTT1* y *TtheMTT5* respectivamente en la cepa salvaje SB1969

La expresión de los genes *TtheMTT1* y *TtheMTT5* en respuesta a metales ha sido estudiada en este mismo trabajo en la cepa SB1969 tipo silvestre de *T. thermophila* (apartado A.4.1 de R). La cuantificación *in vitro* de la expresión de luciferasa, bajo el control de los promotores de MTs, además de caracterizar la respuesta de cada biosensor, ratificó los resultados del análisis de la expresión de los genes *TtheMTT1* y *TtheMTT5*. Aunque son experimentos diferentes, con distintas condiciones de tratamiento (tiempo, concentración de metal, y medio de exposición) y distinta metodología (RT-PCR cuantitativa vs. un ensayo enzimático), podemos comparar los máximos niveles de inducción de la expresión de luciferasa alcanzados en cada biosensor con el análisis de los niveles de expresión de los genes *TtheMTT1* y *TtheMTT5* de la cepa SB1969 (Figura 21). El *ranking* obtenido es similar para ambos genes en los dos tipos de análisis, sin considerar los metales que sólo fueron empleados en uno de los dos experimentos (Ni, Hg y As), lo que corrobora la fiabilidad de los resultados obtenidos en cualquiera de los dos experimentos.

Según los experimentos de RT-PCRq (1h) (Figura 21) el promotor de *TtheMTT1* responde principalmente a Cd y Zn, lo que también se refleja en los experimentos de actividad luciferasa (Tabla 36). Según los niveles de expresión de la luciferasa, el promotor de *TtheMTT1* es activado principalmente por Cd y Zn y también por Hg. En nuestros experimentos de RT-PCRq (obtenidos previamente al desarrollo del biosensor) no habíamos empleado el Hg. Sin embargo, Dondero *et al.* (2004) detectaron que el promotor del gen *TtheMTT1* responde principalmente a Cd y Hg, corroborando así nuestros resultados. Además, la valoración de la expresión de luciferasa de la cepa MTT1Luc ratificó que el promotor del gen *TtheMTT1* sí que responde a Zn, como se discutió en el apartado C.3.3 de D.

Respecto al promotor del gen *TtheMTT5*, tanto el biosensor MTT5Luc como el análisis de expresión por RT-PCRq (1h) de este mismo gen en la cepa SB1969, coinciden en que el Pb y después el Cd son los metales que mayores niveles de inducción producen (Tabla 36). Sin embargo, los perfiles difieren para los metales esenciales Cu y Zn. Según los resultados de la RT-PCRq, el Cu apenas induce la expresión del gen *TtheMTT5* en la cepa SB1969, y el nivel de expresión observado no es estadísticamente significativo con respecto al basal. Por el contra-

	Promotor MTT1	Promotor MTT5	Condiciones	Cepa
RT-PCRq	Cd>Zn>Pb>Cu >Ni	Pb>Cd>Zn>Cu>Ni	1 h en PP210	SB1969
Luciferasa	Cd>Hg>Zn>Cu>As>Pb	Pb>As>Cd>Cu>Zn>Hg	2 h en	MTTLUC
Sensibilidad de detección ¹	Cd>Hg>As>Zn>Pb>Cu	Cd>Hg>As>Pb>Cu>Zn	TrisHCl	

Tabla 36. Ranking de los niveles de inducción de la apertura de los promotores involucrados en la expresión de los genes *TtheMTT1* o *TtheMTT5* (cuantificados por RT-PCRq, Figura 21), o el gen *lucFF* bajo control del promotor de *TtheMTT1* o *TtheMTT5* (cuantificados mediante ensayos enzimáticos de actividad luciferasa, Figura 59). ¹El orden de sensibilidad mostrado se refiere a los metales que pueden ser detectados a menores concentraciones por cada biosensor (cepas MTT1Luc o MTT5Luc).

rio, este metal sí que produce un incremento en los niveles de expresión de luciferasa en el biosensor MTT5Luc. Los resultados del biosensor coinciden con los observados por Santovito *et al.* (2007), quienes detectaron que el Cu inducía la expresión del gen *TtheMTT5* a mayores niveles que lo hace el Zn. Las diferencias observadas entre nuestros datos de RT-PCRq con los de Santovito *et al.* (2007) se deben muy probablemente a las diferentes condiciones de experimentación (como ya se comentó en el apartado A.8 de D), y a las diferentes concentraciones de Cu empleadas. El hecho de que Santovito *et al.* (2007) utilizarasen 630 μ M de Cu para el análisis de expresión, mientras que nosotros utilizamos 315 μ M de Cu podría explicar por qué nosotros no detectamos un aumento en los niveles de ARNm del gen *TtheMTT5* en respuesta a Cu (Figura 21, apartado A.4.1 de R). En cambio, para cuantificar la expresión de luciferasa en el biosensor MTT5Luc utilizamos un rango de concentraciones de Cu, por lo que en este experimento sí detectamos el efecto inductor del Cu sobre el promotor de *TtheMTT5*.

La respuesta transcripcional de los biosensores (MTT1Luc y MTT5Luc) analizada por RT-PCRq (Figura 63) es consistente con lo observado en los ensayos de luciferasa. Tras 2 horas de exposición a 5×10^{-7} M de los metales Cd, Cu, Zn o Pb; sólo Cd y Pb producen un aumento significativo ($p < 0,05$) de la transcripción del gen *lucFF* en ambos biosensores (Figura 63). El Cu también produce una inducción (estadísticamente significativa respecto de los niveles basales) de la expresión de *lucFF* en la cepa MTT5Luc, pero el valor obtenido no es superior a 2. Por lo tanto, también el análisis de la respuesta de los biosensores a nivel transcripcional confirma que el Cd es el mejor activador de los promotores de los genes *TtheMTT1* y *TtheMTT5*, junto con el Pb para éste último. Se corroboran así los resultados de los análisis de RT-PCRq realizados en la cepa SB1969 (apartado RA.4.1 de R), y la inclusión de *TtheMTT1* y *TtheMTT5* dentro de la subfamilia Cd-MTs de *Tetrahymena*.

La introducción de las construcciones reporteras $P_{MTT1}::lucFF$ o $P_{MTT5}::lucFF$ (en las cepas MTT1Luc o MTT5Luc respectivamente) no alteran la expresión de los genes macronucleares *TtheMTT1* y *TtheMTT5*. Como hemos comprobado, el Cd induce la expresión de los genes *TtheMTT1* y *TtheMTT5* a los mismos niveles (~ 33 y ~ 260 veces los niveles basales respectivamente) tanto en las cepas recombinantes MTT1Luc y MTT5Luc como en la cepa salvaje no transformada SB1969. Es decir, en las tres cepas el patrón de expresión de los genes *TtheMTT1* y *TtheMTT5* es similar cuando son expuestas a la misma concentración de Cd (5×10^{-7} M) (Figura 64).

Los promotores P_{MTT1} o P_{MTT5} de las construcciones reporteras ($P_{MTT1}::lucFF$ y $P_{MTT5}::lucFF$)

integradas en el locus *btu1-1* se comportan de la misma manera que los P_{MTT1} y P_{MTT5} situados en los loci macronucleares *mtt1* y *mtt5* respectivamente. En los biosensores, la expresión del gen *lucFF* (bajo control de los promotores P_{MTT1} o P_{MTT5}) alcanza aproximadamente los mismos niveles de inducción por Cd, que los genes macronucleares *TtheMTT1* o *TtheMTT5* (bajo control de su P_{MTT1} o P_{MTT5} respectivamente) (Figuras 63 y 64).

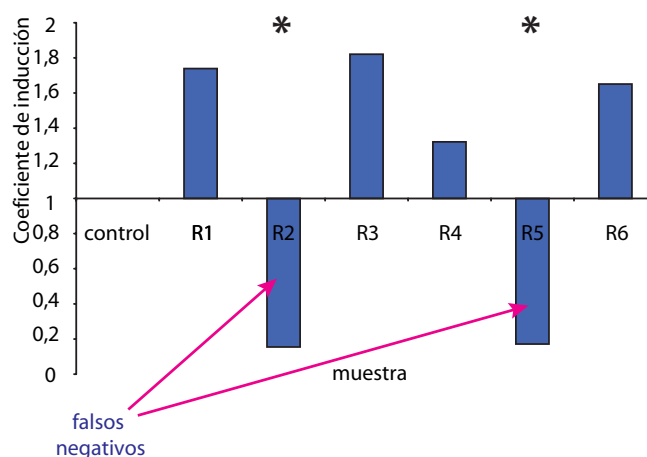
C.3.5 La expresión basal de la construcción reportera puede utilizarse para identificar resultados falsos negativos

En teoría, lo deseable es que el biosensor produzca únicamente bioluminiscencia en presencia del metal, que una vez dentro de la célula interaccionará con la proteína reguladora activando la respuesta del biosensor. Sin embargo, debido a las condiciones del bioensayo y las características de los promotores de los genes *TtheMTT1* y *TtheMTT5*, siempre hay un cierto nivel basal de expresión de luciferasa, y por tanto de bioluminiscencia, incluso cuando los biosensores no son expuestos al metal. Los genes *TtheMTT1* y *TtheMTT5* tienen cierto nivel de expresión constitutiva (apartado A.4.1 de R), aunque este nivel de expresión basal es significativamente mucho menor al nivel de expresión inducida por los metales. El estrés asociado con la inanición puede contribuir también a la expresión de *lucFF* bajo control del P_{MTT5} . No obstante, al igual que en el caso de la expresión constitutiva los niveles de expresión del biosensor en tampón Tris-HCl se mantenían constantes, por lo que la pequeña inducción tras 2 horas de inanición no compromete la medida de expresión de la luciferasa en los biosensores. Otros biosensores basados en promotores de MTs también presentan un cierto nivel de expresión basal y son inducibles también por inanición, pero siempre significativamente muy inferior al nivel de expresión inducida por metales (Williams *et al.* 2009).

Sin embargo, la expresión basal de la construcción reportera puede ser aprovechada para evitar resultados falsos negativos en el bioensayo. Si la expresión basal de luciferasa en el biosensor es relativamente constante en ausencia de metales, un descenso en los niveles de expresión basal de luciferasa podría indicar que la muestra contiene algún tóxico o concentraciones de metales tan altas que disminuyen la tasa metabólica del biosensor o incluso el número de células (Sorensen *et al.* 2006). Por lo tanto, si tras la exposición a la muestra problema el nivel de bioluminiscencia es similar al basal, el resultado sería un verdadero negativo, es decir, ausencia de metales en la muestra. Pero si tras la exposición del biosensor a la muestra, los niveles de bioluminiscencia son menores que los basales, lo más probable es que la muestra contenga una gran cantidad de metales o también algún tóxico que inhiba el metabolismo celular del biosensor, o que incluso sea letal para las células. Éste sería, por consiguiente, un resultado falso negativo y habría que repetir el análisis diluyendo la muestra con el tampón o agua estéril. Este tipo de situación se ilustra en la Figura 75, en este experimento dos muestras de tierra habían sido contaminadas con una concentración de Cd tóxica para la célula pero no letal (0,05 M). Cuando se cuantificó la expresión de luciferasa *in vitro*, se observó que la activi-

dad luciferasa en esas dos muestras era menor que los niveles basales (obtenidos del control constituido por células incubadas en tampón Tris-HCl) y que en el resto de muestras no contaminadas. Gracias a la expresión basal de la construcción reportera se identificaron esos dos resultados como falsos negativos.

Figura 75. Identificación de resultados falsos negativos empleando el biosensor MTT-5Luc. La expresión basal de la construcción reportera $P_{MTT5}:lucFF$ (o $P_{MTT1}:lucFF$ en el caso del biosensor MTT1Luc) puede aprovecharse para detectar resultados falsos negativos, de forma que niveles de expresión de luciferasa por debajo de los niveles basales indicaría la presencia de un tóxico o concentraciones de metales demasiado altas que inhiben la producción de luminiscencia. Los asteriscos indican las alícuotas de la muestra que fueron contaminadas con una solución de Cd 0,05 M. R1-R6: alícuotas provenientes de la misma muestra de suelo (muestra libre de metales recolectada en El Parque del Retiro, Madrid). Control: células incubadas durante 2 horas en tampón Tris-HCl 0,01 M pH 6,8.



Según nuestros análisis, las cepas MTT1Luc y MTT5Luc sólo incrementan su bioluminiscencia de manera significativa cuando son expuestas a metales, y no ante otras condiciones de estrés (Figura 62). En cualquier caso, la posible existencia de resultados falsos positivos, esto es, que el biosensor incremente la expresión de luciferasa en muestras que no contengan metales, también podría ser detectada. Por ejemplo, la muestra en la que se quiere determinar la presencia de metales se divide en dos alícuotas, y una de ellas se trata con un agente quelante de metales como el EDTA. Un ejemplo de esta situación se ilustra en la Figura 76. Si las dos alícuotas inducen la expresión de luciferasa del biosensor a los mismos niveles significará que la muestra contiene alguna sustancia (no metal) que induce la expresión de luciferasa del biosensor (Figura 76, B). Si por el contrario, la alícuota que contiene EDTA produce un menor incremento en la expresión de luciferasa, significa que la respuesta que observamos del biosensor se debe únicamente a la presencia de metales en la muestra (Figura 76, A).

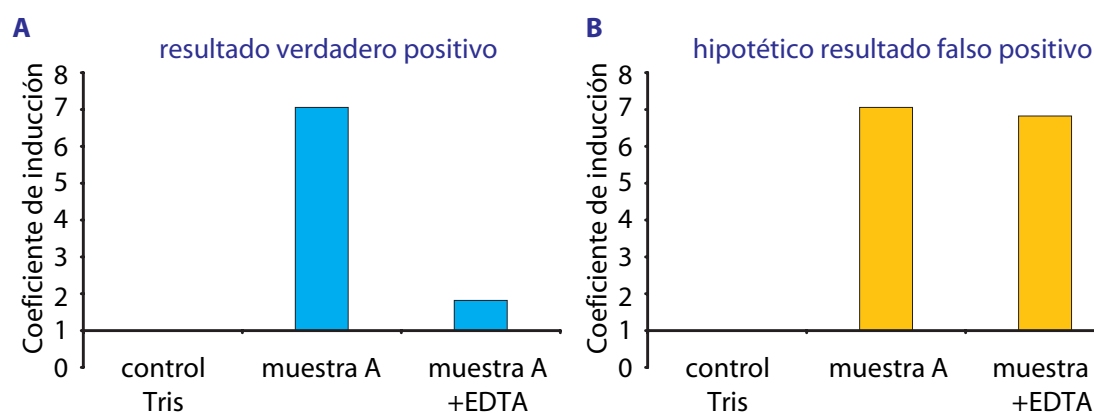


Figura 76. Identificación de resultados falsos positivos mediante el uso de EDTA. **(A):** resultado obtenido verdadero positivo, es decir, la muestra A (suelo de un jardín de Estocolmo) contiene metales pesados que incrementan la expresión de luciferasa del biosensor. **(B):** situación hipotética de un resultado falso positivo, la muestra no contiene metales biodisponibles, puesto que la adición de EDTA no disminuye la respuesta del biosensor. Ver texto para una explicación más detallada.

C.3.6 Variabilidad de la respuesta

Cada experimento fue repetido al menos tres veces, observándose una cierta variabilidad en los niveles de inducción. Se realizaron repeticiones en días distintos, con cultivos y soluciones diferentes de metales. Aunque el patrón de inducción observado siempre era el mismo, a veces variaba el nivel de inducción de la expresión del gen reportero respecto el nivel basal. Esto podría ser debido a la variación biológica intrínseca del biosensor. Se ha indicado que incluso en una población clonal existe una cierta variabilidad/heterogeneidad genotípica y fenotípica entre los clones (Davey y Kell 1996; Bridson y Gould 2000; Brehm-Stecher y Johnson 2004). Puesto que la expresión del gen reportero está determinada por muy diversos factores como la concentración, localización, actividad, etc. de diversas moléculas (factores de transcripción, polimerasas, etc.), las fluctuaciones en la cantidad y actividad de estas moléculas tendrán como consecuencia variaciones en los niveles de expresión de la proteína reportera (Elowitz *et al.* 2002).

Para reducir la variabilidad de la respuesta del biosensor se establecieron controles endógenos. Por una parte se llevo a cabo un recuento celular previamente a la exposición a la muestra, de forma que el número de células expuestas a la muestra fuese aproximadamente siempre el mismo ($1-3 \times 10^5$ células/ml). Y por otra parte, la cuantificación de quimioluminiscencia *in vitro* fue normalizada respecto al contenido de proteína total, determinada por el método de Bradford. A pesar de la eficacia de estos sistemas de control, aún se obtiene cierta variación en el nivel de inducción del biosensor como respuesta al metal. En nuestro caso, los recuentos celulares fueron realizados utilizando una cámara de *Neubauer*, por lo que este punto se podría optimizar aún más empleando un contador celular automático, que permite una mayor precisión en la medida y en menor tiempo.

La normalización de la expresión de un gen reportero respecto al contenido en proteína total es adecuada cuando las células presentan el gen reportero integrado de forma estable (Schagat 2007), como es nuestro caso. No obstante, hay otros métodos adicionales para normalizar la medida y así disminuir la variabilidad de los resultados (Schagat 2007). En general, cuando se utiliza el gen *lucFF* como reportero en estudios de análisis de expresión se emplean sistemas duales, en los que la célula recombinante además del gen *lucFF* presenta otro gen reportero bajo control de un promotor constitutivo, y cuya expresión no se modifica al llevar a cabo los bioensayos (Schagat 2007). Esta táctica se ha utilizado en bacterias, realizando una cotransfección con el vector que contiene la construcción reportera de interés y el vector control. Sin embargo, nuestro objetivo era obtener transformantes estables, y por ello con la construcción reportera en el locus macronuclear *btu1-1*. Hasta ahora, en *T. thermophila* no se dispone de un sistema que permita integrar en el genoma macronuclear dos construcciones reporteras distintas y al mismo tiempo se pueda seleccionar las células recombinantes que hayan integrado en su genoma las dos construcciones. Pero no descartamos la posibilidad de que exista en un futuro.

A pesar de la cierta variabilidad existente, los bioensayos de tipo ciego demostraron la reproducibilidad de la respuesta del biosensor MTT5Luc, libre además de las posibles preconcepciones del investigador.

C.3.7 Especificidad y sensibilidad de la respuesta de los biosensores. Las cepas MTT1Luc y MTT5Luc son capaces de detectar diferentes metales pesados en concentraciones del orden de nanomolar

La mayoría de los biosensores celulares para metales construidos están basados en bacterias genéticamente modificadas (Verma y Singh 2005; Magrisso *et al.* 2008). A pesar de las ventajas que presentan los microorganismos eucariotas (Walmsley y Keenan 2000), muy pocas especies eucariotas han sido explotadas en comparación con las procariotas. Actualmente sólo se han descrito dos biosensores celulares específicos para metales basados en dos microorganismos eucariotas, las levaduras *S. cerevisiae* y *Hansenula polymorpha* (Lehmann *et al.* 2000; Shetty *et al.* 2004; Park *et al.* 2007). Aunque también se han descrito biosensores celulares basados en microalgas, capaces de detectar metales en agua marina, están más bien enfocados para determinar la toxicidad de una muestra debida a la presencia de metales, herbicidas o compuestos orgánicos tóxicos, por lo que no serán considerados en este trabajo (Durrieu y Tran-Minh 2002; Tonnina *et al.* 2002). Respecto a organismos pluricelulares, también se han construido biosensores para metales a partir del nemátodo *C. elegans* (Güven *et al.* 1994; Stringham y Candido 1994; Cioci *et al.* 2000; Lagido *et al.* 2001; Williams *et al.* 2009), aunque algunos de ellos son en realidad biosensores de toxicidad general, ya que detectan diferentes contaminantes (Lagido *et al.* 2001).

En las Tablas 37 y 38 se muestran y comparan los principales biosensores celulares procariotas y eucariotas desarrollados y publicados hasta ahora, incluyendo los diseñados en este trabajo. Algunos de ellos son bastante específicos y presentan construcciones que responden únicamente a uno o dos metales como *pbr::luxCDABE* de *Cupriavidus metallidurans* que responde únicamente a Pb (Corbisier *et al.* 1999), o *copBC::luxAB* de *Pseudomonas fluorescens* que responde sólo a Cu (Tom-Petersen *et al.* 2001). Sin embargo, la mayoría de los biosensores responden a dos o más metales. Por ejemplo, muchos de los que responden a Cd también lo hacen a Pb, Hg, As o Zn (*cadC* responde a Cd, Pb, Sb, Sn o Zn; *araR* responde a As, Cd y Sb, y *zntA* a Cd, Cr, Hg, Pb y Zn) (Tablas 37 y 38). En algunos casos, un biosensor aparece descrito como específico de uno o dos metales pese a que no se ha analizado su respuesta frente a otros metales. Y en otros casos sólo se analiza una concentración determinada (y no un rango de concentraciones) de distintos metales para comprobar el grado de selectividad del biosensor (Liao *et al.* 2006). En estos casos podría ocurrir que, aunque no se detecte una respuesta del biosensor ante una determinada concentración de otro metal, concentraciones mayores sí puedan inducir la expresión del gen reportero.

En general parece que los biosensores eucariotas son menos específicos que los pro-

Promotor	Gen reportero	R	Metal	Sensibilidad (μM)	Microorganismo	Tiempo inducción	MN	Referencia
<i>arsB</i>	<i>blaZ</i>	6	As ³⁺	1	<i>S. aureus</i>	1 h	NO	(Ji y Silver 1992)
		4	As ⁵⁺	10				
		--	Bi	100				
		--	Sb	0,2				
<i>arsB</i>	<i>luxAB</i>	3	As ³⁺	0,01	<i>E. coli</i>	2 h	NO	(Cai y DuBow 1997)
<i>arsR</i>	<i>lucFF</i>	2	As ³⁺	0,01	<i>E. coli</i>	8 h	NO	(Hakkila et al. 2002)
	<i>luxCDABE</i>	2	As ³⁺	0,01	<i>E. coli</i>			
<i>arsR</i>	<i>lacZ</i>	1	As ³⁺	10 ⁻⁹	<i>E. coli</i>	30 min	NO	(Ramanathan et al. 1997)
	<i>lacZ</i>	--	Sb	10 ⁻⁹	<i>E. coli</i>			
<i>arsR</i>	<i>lucFF</i>	7	As ³⁺	3,3	<i>E. coli</i>	1,5 h	SI	(Tauriainen et al. 1999)
	<i>lucFF</i>	5	As ⁵⁺	33				
	<i>lucFF</i>	14	Cd	10				
	<i>lucFF</i>	--	Sb	0,1				
<i>arsR</i>	<i>luxAB</i>	4	As ³⁺	0,1	<i>E. coli</i>	1 h	NO	(Stocker et al. 2003)
<i>arsR</i>	<i>luxAB</i>	4	As ³⁺	0,1			SI	(Trang et al. 2005)
<i>arsR</i>	<i>gfp</i>	4	As ³⁺	0,12		12 h	NO	(Roberto et al. 2002)
<i>arsR</i>	<i>lucGR</i>	4	As ³⁺	0,1	<i>P. fluorescens</i>	2 h	SI	(Petanen et al. 2001)
<i>arsR</i>	<i>lucFF</i>	9	Cd	0,330	<i>S. aureus</i>	2 h	NO	(Tauriainen et al. 1997)
		--	Sb	0,033				
<i>arsR</i>	<i>gfp</i>	5	As ³⁺	0,4	<i>E. coli</i>	2 h	SI	(Liao y Ou 2005)
		3	As ⁵⁺	1				
		--	Sb	0,75				
<i>arsRD</i>	<i>lacZ</i>	4	As ³⁺	0,1	<i>E. coli</i>	17 h	NO	(Scott et al. 1997)
		--	Sb	0,1				
<i>cadAC</i>	<i>blaZ</i>	10	Cd	0,5	<i>S. aureus</i>	1,5 h	NO	(Yoon et al. 1991)
<i>cadC</i>	<i>lucFF</i>	2	Cd	0,003	<i>B. subtilis</i>	1,5 h	NO	(Tauriainen et al. 1998)
		8	Pb	1				
		--	Sb	0,033				
		--	Sn	33				
<i>cadC</i>	<i>lucFF</i>	7	Zn	100	<i>S. aureus</i>	1,5 h	NO	(Tauriainen et al. 1998)
		4	Cd	0,010				
		4	Pb	0,033				
		--	Sb	0,001				
<i>cadC</i>	<i>gfp</i>	1	Cd	0,0001	<i>E. coli</i>	2 h	SI	(Liao et al. 2006)
		2	Pb	0,01				
		--	Sb	0,0001				
<i>chrB</i>	<i>lacZ</i>	--	Cr	0,001	<i>A. aeotrophus</i>	8 h	NO	(Peitzsch et al. 1998)
<i>chrB</i>	<i>luxCDABE</i>	--	Cr ³⁺	5		1,5 h	NO	(Corbisier et al. 1999)
		--	Cr ⁶⁺	2,5				
<i>chrAB</i>	<i>lucFF</i>	--	Cr ³⁺	2	<i>C. metallidurans</i>	2 h	SI	(Ivask et al. 2002)
		--	Cr ⁶⁺	0,04				
<i>cnrXYH</i>	<i>luxDABE</i>	--	Co	9		16 h	SI	(Tibazarwa et al. 2001)
		--	Ni	0,1				
<i>coaT</i>	<i>luxAB</i>	--	Co	0,3	<i>Synechocystis</i>	3 h	SI	(Peca et al. 2008)
		2	Zn	1				
<i>copA</i>	<i>luxCDABE</i>	--	Ag	0,3	<i>E. coli</i>	80 min	NO	(Riether et al. 2001)
		6	Cu	3				
<i>copA</i>	<i>lucFF</i>	--	Ag	0,003	<i>E. coli</i>	2 h	SI	(Hakkila et al. 2004)
		1	Cu	0,3				
<i>copBC</i>	<i>luxAB</i>	3	Cu	1	<i>P. fluorescens</i>	3 h	SI	(Tom-Petersen et al. 2001)
<i>copSRA</i>	<i>luxCDABE</i>	3	Cu	1	<i>C. metallidurans</i>	1,5 h	NO	(Corbisier et al. 1999)
<i>isiAB</i>	<i>luxAB</i>	--	Fe	0,001	<i>Synechococcus</i>	12 h	SI	(Boyanapalli et al. 2007)
<i>fliC</i>	<i>luxAB</i>	--	Al	40	<i>E. coli</i>	20 min	NO	(Guzzo et al. 1992)
<i>katG</i>	<i>luxCDABE</i>	12	Cd	2	<i>E. coli</i>	1,5 h	NO	(Ben-Israel et al. 1998)
<i>merR</i>	<i>lucFF</i>	11	Cd	1	<i>E. coli</i>	1 h	NO	(Virta et al. 1995)
		1	Hg	10 ⁻⁹				
<i>merR</i>	<i>gfp</i>	7	Hg	0,005	<i>E. coli</i>	8h	NO	(Hakkila et al. 2002)
	<i>lucFF</i>	7	Hg	0,005				
	<i>luxCDABE</i>	5	Hg	0,0001				
<i>merR</i>	<i>lucFF</i>	11	Cd	1	<i>P. fluorescens</i>	2 h	SI	(Petanen et al. 2001)
		3	Hg	10 ⁻⁵				

Tabla 37. Principales biosensores celulares procariotas actualmente desarrollados para la detección de metales pesados.

Promotor	Gen reportero	R	Metal	Sensibilidad (μM)	Microorganismo	Tiempo inducción	MN	Referencia
<i>merRB</i>	<i>lucFF</i>	8	Cd	0,27	<i>E. coli</i>	2 h	SI	(Ivask et al. 2002)
		10	Hg	0,1				
		10	Zn	1380				
<i>merRB</i>	<i>lucFF</i>	6	Hg	0,0002	<i>E. coli</i>	2 h	NO	(Ivask et al. 2001)
<i>merRT</i>	<i>luxCDABE</i>	7	Hg	0,005	<i>E. coli</i>	40 min	SI	(Selifonova et al. 1993)
<i>merRT</i>		2	Hg	$2,5 \times 10^{-6}$	<i>V. anguillarum</i>	80 min	NO	(Golding et al. 2002)
<i>merRTPA</i>	<i>luxCDABE</i>	4	Hg	5×10^{-5}	<i>E. coli</i>		NO	(Pepi et al. 2006)
<i>NsrBCD</i>	<i>luxAB</i>	--	Ni	0,2	<i>Synechocystis</i>	3 h	SI	(Peca et al. 2008)
<i>pbrR</i>		10	Pb	500	<i>C. metallidurans</i>	3 h	NO	(Corbisier et al. 1999)
<i>pbrO/P/R</i>	<i>gfp</i>	9	Pb	50	<i>E. coli</i>	16 h	SI	(Chakraborty et al. 2008)
<i>pvd</i>	<i>gfp</i>	--	Fe	0,1	<i>Pseudomonas</i>	12 h	NO	(Joyner y Lindow 2000)
<i>smtA</i>	<i>luxCDABE</i>	1	Zn	0,5	<i>Synechococcus</i>	4 h	NO	(Huckle et al. 1993)
<i>smtB</i>	<i>LuxCDABE</i>	1	Zn	0,5	<i>Synechococcus</i>	1 h	NO	(Erbe et al. 1996)
		9	Cd	0,5				
		7	Cu	4				
<i>zntA</i>	<i>lacZ</i>	1	Cd	0,0001	<i>E. coli</i>	2 h	NO	(Shetty et al. 2003)
	<i>Red-shifted</i>	6	Cd	0,1				
	<i>gfp</i>							
	<i>lacZ</i>	1	Pb	0,0001				
<i>zntA</i>	<i>Red-shifted</i>	6	Pb	0,1	<i>E. coli</i>	80 min	NO	(Riether et al. 2001)
	<i>gfp</i>							
	<i>luxCDABE</i>	4	Cd	0,01				
		4	Zn	3				
<i>zntA</i>		--	Cr^{6+}	30	<i>E. coli</i>	1 h	SI	(Biran et al. 2000)
		12	Hg	1				
		3	Pb	0,031				
<i>zntA</i>	<i>lacZ</i>	5	Cd	0,025	<i>E. coli</i>	1 h	SI	(Biran et al. 2000)
<i>zntR</i>	<i>lucFF</i>	6	Cd	0,05	<i>E. coli</i>	2 h	SI	(Ivask et al. 2002)
		8	Hg	0,01				
		6	Zn	40				

Tabla 37. (continuación) Principales biosensores celulares procariotas actualmente desarrollados para la detección de metales pesados. Se indican los elementos de las construcciones reporteras (promotor, gen reportero) de cada biosensor y su nivel mínimo de detección (sensibilidad) (μM) para cada tipo de metal ensayado. R: indica la posición en el ranking de cada biosensor según su nivel de detección (sensibilidad) para cada metal y respecto al resto de biosensores existentes (procariotas o eucariotas). El tiempo de inducción se refiere al tiempo de exposición del biosensor al metal para que se produzca la respuesta. MN: indica SI o NO el biosensor ha sido ensayado con muestras naturales, según la información disponible en la literatura científica. *A. aeotrophus*: *Alcaligenes aeotrophus*. *B. subtilis*: *Bacillus subtilis*. *C. metallidurans*: *Cupravidus metallidurans*. *E. coli*: *Escherichia coli*. *P. fluorescens*: *Pseudomonas fluorescens*. *S. aureus*. *Staphylococcus aureus*. *V. anguillarum*: *Vibrio anguillarum*.

cariotas, esto es que los primeros responden a un conjunto de metales más amplio. Las cepas MTT1Luc y MTT5Luc de *T. thermophila* obtenidas en este trabajo, al igual que el resto de biosensores eucariotas, responden a varios metales pesados. Recientemente Ivask *et al.* (2009) han analizado la respuesta de varios biosensores procariotas bioluminiscentes a diferentes metales pesados, y como se esperaba, la bioluminiscencia de las distintas cepas analizadas era inducida por varios metales (Ivask *et al.* 2009). La menor especificidad de la respuesta a metales pesados puede deberse a la evolución de los mecanismos de resistencia a metales, para ser inducidos por varios metales con la finalidad de detoxificarlos. También se podría deber a que las proteínas reguladoras de estos sistemas sean incapaces de diferenciar entre distintos iones bivalentes como Cd^{2+} , Zn^{2+} o Pb^{2+} (Nies 2007). Por ejemplo, las proteínas procariotas ArsR y CadC presentan la misma región aminoácida conservada que es la responsable de la unión al metal, por ello el Cd puede interaccionar con ArsR abriendo el promotor (Petanen *et al.* 2001).

En general, la concentración mínima de metal que induce el sistema biosensor (sensibilidad) de los biosensores celulares descritos es bastante baja (Tablas 37 y 38). Así, en algunos

Promotor	Gen reportero	R	Metal	Sensibilidad (μM)	Organismo	Tiempo inducción	MN	Referencia
<i>cup1</i>	<i>gfp</i>	2	Cu (Ag)	0,5	<i>S. cerevisiae</i>	2 h	NO	(Shetty et al. 2002)
<i>cup1</i>		10	Cu	500		20 min	NO	(Lehmann et al. 2000)
<i>SEO1</i>	<i>gfp</i>	10	Cd (As, Hg)	1	<i>S. cerevisiae</i>	2 h	NO	(Park et al. 2007)
		10	Cd (As, Hg)	1	<i>H. polymorpha</i>			
<i>hsp16</i>	<i>lacZ</i>	15	Cd	25	<i>C. elegans</i>	7 h	NO	(Stringham y Candido 1994)
		14	Hg	3,7				
<i>hsp70</i>	<i>lacZ</i>	13	Cd	2,7	<i>C. elegans</i>		NO	(Guven et al. 1994)
		13	Hg	1,8				
		8	Zn	150				
<i>mtl2</i>	<i>lacZ</i>	7	Cd	0,1	<i>C. elegans</i>	24 h	NO	(Cioci et al. 2000)
		11	Hg	0,2				
		--	Ni	10				
		5	Zn	10				
<i>let858</i>	<i>lucFF</i>	9	Cu	200	<i>C. elegans</i>	2 h	NO	(Lagido et al. 2001)
			No metales					
<i>mtl2</i>	<i>gfp</i>	12	Cd	5	<i>C. elegans</i>	24 h	SI	(Williams et al. 2009)
		12	Hg	1				
		8	Cu	50				
		9	Zn	250				
		--	Ni, Pb, As	NO				
<i>MTT1</i>	<i>gfp</i>	9	Cd	0,4	<i>T. thermophila</i>	2 h	NO	Este trabajo
<i>MTT1</i>	<i>lucFF</i>	5	Cd	0,025-0,05	<i>T. thermophila</i>	2 h	SI	Este trabajo
		5	Cu	2,5				
		1	Zn	0,5				
		7	Pb	0,5				
		2	As ⁵⁺	0,05				
		9	Hg	0,025				
<i>MTT5</i>	<i>lucFF</i>	3	Cd	0,005-0,025	<i>T. thermophila</i>	2 h	SI	Este trabajo
		4	Cu	1,5				
		3	Zn	1,50				
		5	Pb	0,05				
		1	As ⁵⁺	0,025				
		9	Hg	0,025				

Tabla 38. Principales biosensores celulares eucariotas desarrollados para la detección de metales pesados. Se indican los elementos de las construcciones reporteras de cada biosensor y su sensibilidad (μM) de detección para cada metal. P: indica la posición de cada biosensor según su sensibilidad de detección para cada metal y respecto al resto de biosensores existentes (procariotas y eucariotas). El tiempo de inducción se refiere al tiempo de exposición del biosensor a la muestra para que se produzca la respuesta. MN: se indica SI o NO dependiendo de si el biosensor ha sido ensayado en muestras ambientales según la información disponible en la literatura científica. *C. elegans*: *Caenorhabditis elegans*. *H. polymorpha*: *Hansenula polymorpha*. *S. cerevisiae*: *Saccharomyces cerevisiae*. *T. thermophila*: *Tetrahymena thermophila*.

casos, la concentración mínima de metal detectable puede ser del orden nanomolar (Tauriai-nen *et al.* 1998; Shetty *et al.* 2003; Liao *et al.* 2006) o incluso picomolar y femtomolar (Virta *et al.* 1995; Petanen *et al.* 2001; Pepi *et al.* 2006). Mediante la modificación genética se ha conseguido desarrollar biosensores celulares tan sensibles como las metodologías físico-químicas (Magris-so *et al.* 2008).

En general la sensibilidad de los biosensores bacterianos es mayor que la de los bio-sensores eucariotas para todos los metales analizados, excepto para el As y Zn (Tablas 37 y 38). Los biosensores MTT1Luc y MTT5Luc son capaces de detectar concentraciones de As⁵⁺ de hasta 50 y 25 nM, por lo que parecen ser los biosensores celulares con el mayor nivel de sensi-bilidad para As⁵⁺ (Tabla 38). Muchos de los biosensores bacterianos existentes en la actualidad pueden detectar concentraciones de As³⁺ tan bajas como 10⁻⁹ μM (Tabla 38). Sin embargo, la sensibilidad de los biosensores bacterianos para el As⁵⁺ es menor (la mínima concentración de

As⁵⁺ detectable por un biosensor procariota es 1 µM), probablemente debido a que la especie As³⁺ es más tóxica (Páez-Espino *et al.* 2009). Como ya hemos indicado, en *T. thermophila* el As⁵⁺ es uno de los mejores inductores de la expresión del gen *TtheMTT5* (Figura 21), por lo que en el promotor de *TtheMTT5* deben existir elementos reguladores que respondan igualmente a la presencia de este metaloide.

Además, la cepa de *T. thermophila* MTT1Luc junto a dos cepas procariotas recombinantes de *Synechococcus* (Huckle *et al.* 1993; Erbe *et al.* 1996) representan los biosensores celulares capaces de detectar las menores concentraciones de Zn de los descritos en la actualidad (Tablas 37 y 38). Curiosamente en los tres biosensores el elemento sensor es un promotor de un gen MT.

A pesar de que los biosensores procariotas, en general, detectan concentraciones de metales inferiores a los eucariotas, la cepa MTT5Luc se encuentra entre los tres biosensores celulares capaces de detectar las menores concentraciones de Cd (Tablas 37 y 38), sólo superado por las cepas recombinantes de *E. coli* que expresan la construcción *cadC-gfp* (0,1 nM) (Liao *et al.* 2006) o *zntA-lacZ* (0,1 nM) (Shetty *et al.* 2003) y una cepa de *B. subtilis* con la construcción *cadC-lucFF* (3 nM) (Tauriainen *et al.* 1998). Al igual que MTT5Luc, ninguno de estos tres biosensores celulares es específico para Cd, sino que también responde a otros metales (Pb, Sb, Sn o Zn). La cepa recombinante de *E. coli* construida por Shetty *et al.* (2003) responde a Cd, Pb y Zn pero no puede diferenciar entre los tres metales.

Aunque las cepas MTT1Luc y MTT5Luc pueden detectar el Hg hasta niveles de 25 nM, ocupan la novena posición en el *ranking* de los biosensores celulares con mayor sensibilidad a este metal (Tablas 37 y 38). No obstante la sensibilidad de MTT1Luc y MTT5Luc frente al Hg es 400 veces mayor que la de las levaduras (*S. cerevisiae* y *H. polymorpha*) y de 8-148 veces superior que la presentada por las diferentes cepas de *C. elegans* (Tabla 38). La mayoría de los biosensores bacterianos para Hg están basados en el sistema de detoxificación meR, que es bastante específico (Brown *et al.* 2003). Algunos de ellos además son capaces de detectar las menores concentraciones de este metal pesado (10⁻⁶-10⁻⁹ µM) (Virta *et al.* 1995; Golding *et al.* 2002).

En *Tetrahymena* poco se conoce sobre la detoxificación del Hg, ya que en los únicos trabajos publicados sobre la ecotoxicología de metales en ciliados no se ha analizado aún la respuesta celular a este metal (Gutiérrez *et al.* 2008). Dado que varios genes Cd-MTs en *Tetrahymena* incrementan su expresión cuando la célula es expuesta a Hg (Dondero *et al.* 2004; Fu y Miao 2006; Guo *et al.* 2008), se ha propuesto que las MTs puedan igualmente intervenir en la detoxificación de este metal (Guo *et al.* 2008). Experimentos llevados a cabo *in vivo* en invertebrados confirman que el Cd²⁺, Cu⁺ o Hg²⁺ pueden desplazar al Zn²⁺ de las MTs (Viarengo *et al.* 1985). Igualmente, en vertebrados la afinidad del Hg por MTs es superior a la del Cd o Zn (Kägi y Schaffer 1988). La expresión de diversas isoformas de MTs de *Drosophila* se induce, junto por otros metales, también bajo la presencia de Hg (Atrian 2009).

C.4 Análisis comparativo de los biosensores MTT1Luc y MTT5Luc frente a otros biosensores eucariotas

La ventaja de los organismos eucariotas como sistemas de detección y evaluación de tóxicos es que proporcionan información aplicable más directamente a células vegetales y animales que las bacterias (Walmsley y Keenan 2000; Baronian 2004). Los microorganismos eucariotas como levaduras y ciliados representan una excelente alternativa al uso de líneas celulares animales, puesto que son más fáciles de cultivar, se obtienen mayores densidades celulares a igualdad de tiempo, son más fáciles de manipular, de llevar a cabo análisis genético, toleran un mayor rango de temperatura, pH, etc.

T. thermophila y *S. cerevisiae* son considerados microorganismos eucariotas modelo cuyos genomas completamente secuenciados pueden ser manipulados genéticamente utilizando la mayoría de las técnicas moleculares actuales (Goffeau *et al.* 1996; Turkewitz *et al.* 2002; Baronian 2004; Eisen *et al.* 2006). Sin embargo, la ausencia de pared celular en *T. thermophila* le confiere una ventaja adicional sobre la levadura para ser empleado como biosensor celular ambiental. Uno de los mayores inconvenientes de las levaduras como biosensores es la presencia de la pared celular como barrera selectiva que dificulta la entrada de solutos al interior celular, aumentando la resistencia celular y disminuyendo por tanto la sensibilidad al tóxico (Walmsley y Keenan 2000; Gutiérrez *et al.* 2006). Diversas moléculas presentes en la pared celular de levaduras inmovilizan iones metálicos mediante el proceso de biosorción (Breierova *et al.* 2002), disminuyendo por tanto la fracción biodisponible del metal presente en la muestra.

Los biosensores celulares basados en *T. thermophila* (MTT1Luc y MTT5Luc) desarrollados en este trabajo, representan biosensores eucariotas capaces de detectar las menores concentraciones de metales pesados, a excepción del Cu. El biosensor celular con mayor sensibilidad (0,5 μ M) para este metal es una cepa recombinante de *S. cerevisiae* que expresa el gen *gfp* bajo la acción del promotor de *cup1* (Shetty *et al.* 2004). No obstante, la sensibilidad de las cepas MTT1Luc (2,5 μ M) y MTT5Luc (1,5 μ M) tienen el mismo orden de magnitud (μ M) y sólo cinco o tres veces menor respectivamente, que la de *S. cerevisiae* (0,5 μ M). Sin embargo, el biosensor construido por Shetty *et al.* (2004) es más específico, puesto que la expresión de *gfp* se induce sólo por Cu y Ag (Shetty *et al.* 2004). Los biosensores MTT1Luc y MTT5Luc están basados en promotores de genes Cd-MTs, por lo que se esperaba una menor respuesta a este metal esencial. Sin embargo, como ya se ha comentado en apartados previos, *T. thermophila* presenta dos isoformas de Cu-MTs, (*TheMTT2* y *TheMTT4*), cuyos promotores podrían ser empleados en la construcción de biosensores para la detección de este metal.

Por el contrario, para el resto de metales los biosensores basados en levaduras son menos sensibles que los construidos en *T. thermophila*. Las cepas MTT1Luc y MTT5Luc representan los biosensores celulares eucariotas para metales más sensibles desarrollados hasta la actualidad, puesto que son capaces de detectar algunos metales incluso a concentraciones inferiores a 50 nM (para el Cd, Pb, Hg o As) a diferencia del resto de biosensores eucariotas co-

nocidos (Tabla 38). Las diferencias en cuanto a la sensibilidad son especialmente patentes en el caso del Cd. La cepa MTT5Luc puede detectar el Cd a concentraciones 200 veces menores que las levaduras *S. cerevisiae* y *H. polymorpha* y 20-5.000 veces menor que las diferentes cepas transgénicas de *C. elegans*, desarrolladas hasta ahora (Tabla 38).

C.5 Los biosensores MTT1Luc y MTT5Luc son capaces de detectar la presencia de metales pesados en forma biodisponible en muestras naturales

A pesar de la existencia de un gran número de biosensores celulares para metales desarrollados por distintos grupos de investigación (Tablas 37 y 38), la mayoría de ellos pasan por alto su aplicación a muestras naturales, analizándose exclusivamente la respuesta del biosensor frente a distintas concentraciones de metales presentes en un tampón determinado o en agua destilada (Rodríguez-Mozaz *et al.* 2006). Sin embargo, la utilidad de estos biosensores es su potencial aplicación para detectar metales biodisponibles en muestras naturales (tomadas de un medio acuático o terrestre).

Los experimentos realizados con muestras naturales (de composición compleja) previamente contaminadas en el laboratorio con Cd, demostraron que el biosensor MTT5Luc puede detectar la presencia del metal en muestras ambientales de muy distinta naturaleza. Las muestras que fueron contaminadas con Cd incrementaron la expresión de la luciferasa del biosensor de manera proporcional a la concentración de Cd. En los experimentos realizados en este trabajo, la adición del agente quelante EDTA a las muestras disminuyó la biodisponibilidad del Cd. De tal forma que las muestras contaminadas con una solución de Cd y EDTA produjeron un menor incremento de la luminiscencia en el biosensor MTT5Luc, demostrando de nuevo que el biosensor sólo detecta el Cd biodisponible presente en la muestra, y no el contenido total de metal. Además, el hecho de que la presencia de EDTA en la muestra haga que la inducción de la expresión del gen *lucFF* sea menor, demuestra que la respuesta del biosensor se debe únicamente al Cd, y no a la presencia de otros agentes estresantes que puedan estar presentes en la muestra. Otros autores también han demostrado, mediante la adición de EDTA u otros agentes quelantes a la muestra, que los biosensores celulares pueden diferenciar entre la fracción biodisponible y la quelada del metal presente en la muestra (Tauriainen *et al.* 2000; Riether *et al.* 2001).

Para inducir la expresión del gen *lucFF* en los biosensores MTT1Luc y MTT5Luc, el metal tiene que atravesar la membrana citoplasmática del ciliado. Éste es el requisito fundamental para considerar que un metal se encuentra en forma biodisponible (Semple *et al.* 2004; Liao *et al.* 2006). Por lo tanto, los biosensores celulares representan el mejor modo de determinar la fracción biodisponible de un metal en una muestra. Por el contrario, los biosensores moleculares sólo detectarán el metal no quelado (porque el quelado no se puede unir al elemento sensor), pero no tienen en cuenta si el metal es capaz o no de atravesar la membrana citoplasmática.

A pesar de que la biodisponibilidad es el factor determinante en la toxicidad de los metales, en general este parámetro no se tiene en cuenta a la hora de analizar las muestras naturales. No obstante, la determinación de este parámetro es subjetiva, puesto que el propio biosensor como microorganismo vivo puede modificar la fracción biodisponible del metal, modificando el medio en el que se encuentran él mismo y el metal. Por lo tanto, la medida de biodisponibilidad del metal para un determinado biosensor puede estar sobrestimando o desestimando la fracción de metal que es biodisponible para otro organismo (Semple *et al.* 2004).

El principal factor que determina la biodisponibilidad de los metales es el pH (Fairbrother *et al.* 2007), una acidificación del pH del medio puede provocar un aumento de la fracción biodisponible del metal (Semple *et al.* 2004). Cambiando las condiciones de incubación en el bioensayo, se puede modificar la fracción de metal biodisponible para el mismo biosensor. Por lo tanto, para el uso de biosensores como sistema de detección será necesario desarrollar protocolos de estandarización en función del tipo de análisis a realizar. Por ejemplo, para analizar la biodisponibilidad de los metales presentes en agua potable, sería aconsejable que el medio de exposición del biosensor a la muestra sea ácido, al igual que el estómago del ser humano. El mismo bioensayo a pH neutro podría desestimar la cantidad de metal biodisponible para las células en el entorno ácido del estómago humano (Harms *et al.* 2006).

Como se esperaba, el coeficiente de inducción de la expresión de luciferasa en las muestras contaminadas en el laboratorio (Figura 68) es diferente al de los ensayos con soluciones de Cd en tampón Tris-HCl (Figura 59). Al emplear muestras naturales multitud de factores pueden afectar a la respuesta del biosensor. En primer lugar se espera una disminución de la fracción biodisponible de metal debido a la presencia de materia orgánica y/o microorganismos que puedan quelar el metal presente en el medio natural. Así, del Cd que añadimos a la muestra parte del mismo será quelado y no inducirá la expresión de luciferasa del biosensor. Ésta podría ser la razón de que las concentraciones $2,5-5 \times 10^{-7}$ M de Cd produzcan una menor inducción del gen reportero del biosensor en la muestra de agua natural que la que se obtiene cuando se utiliza el tampón Tris-HCl.

Por otro lado, en la alícuota contaminada con $1,5 \mu\text{M}$ de Cd parte del metal es también quelado, por lo que la muestra no es tan tóxica para el biosensor (en comparación con los ensayos de Cd en tampón Tris-HCl), y así el mejor estatus metabólico del biosensor le permite responder con mayores niveles de luciferasa que para la misma concentración de Cd en tampón Tris-HCl (Figura 59).

Otros factores que pueden afectar a la biodisponibilidad de los metales en las muestras de aguas naturales son el efecto del pH de la muestra sobre el estado de especiación de los iones metálicos, y la presencia de otros iones que podrían provocar la precipitación de una fracción de la sal metálica que añadimos a la muestra (Hughes y Poole 1991; Barkay *et al.* 1997). Además, la presencia de iones metálicos esenciales en la muestra como el Ca^{2+} , puede reducir la entrada de metales no esenciales (como Cd^{2+}) a la célula, compitiendo directamente con los

sistemas de entrada de cationes metálicos, puesto que el Cd^{2+} puede entrar al interior celular a través de los canales de Ca^{2+} (Kiewiet y Ma 1991; Swain *et al.* 2004).

El análisis y la interpretación de la respuesta del biosensor en muestras naturales es mucho más compleja que en soluciones tamponadas realizadas en el laboratorio. Los mismos factores que hemos visto que pueden disminuir la respuesta del biosensor en la muestra, pueden en otros casos incrementarla. Por ejemplo, ya se ha comentado como la acidificación del pH puede aumentar la biodisponibilidad de los metales. Además, la presencia de nutrientes o vitaminas para la célula puede compensar de alguna forma el efecto tóxico del metal (Aruoja *et al.* 2004). Como igualmente se comentó, la producción de luminiscencia requiere una cierta inversión de energía por parte de la célula (ATP, etc.). Por lo tanto, si el biosensor celular goza de un mejor estatus metabólico en una determinada muestra puede que responda con mayores niveles de luminiscencia de lo usual.

En general, las muestras de suelo son evidentemente más complejas que las de agua. El Cd se une con relativa facilidad a las partículas del suelo que presentan ligandos orgánicos, disminuyendo por tanto la biodisponibilidad del metal. Ésta podría ser la razón fundamental por la que ante la misma cantidad de Cd añadido en el laboratorio, en los ensayos ciegos realizados, las muestras de suelo producen un menor incremento en la expresión de luciferasa en el biosensor MTT5Luc que las muestras de agua (Figura 66).

Distintas muestras de suelos naturales (Lago Ontario, Canadá; Parque del Buen Retiro, Madrid; y *Waipoua Forest*, Nueva Zelanda, isla Norte) que por su procedencia geográfica presumiblemente podrían estar libres de contaminación por metales, no indujeron significativamente la expresión de luciferasa en el biosensor MTT5Luc, respecto a los niveles basales (biosensor incubado en tampón Tris-HCl). Demostrando así la fiabilidad de la respuesta del biosensor. La Reserva Natural *Waipoua Forest* es una de las mejores muestras de la selva neozelandesa compuesta principalmente por el kauri (*Agathis australis*), un árbol endémico de la región. Es una zona protegida muy bien conservada por lo que no se espera contaminación por metales pesados.

Sin embargo, la muestra correspondiente al Parque Natural *Wai-O-Tapum Thermal Wonderland* (Nueva Zelanda, isla Norte) resultó letal para el biosensor. Con la finalidad de disminuir la toxicidad de la muestra se preparó una dilución 1/1.000, que produjo un gran incremento de la expresión de luciferasa del biosensor MTT5Luc (Figura 67). *Wai-O-Tapu* (en maorí *Agua Sagrada*) es una zona activa geotermal situada en la zona volcánica de Taupo (Waikato, Nueva Zelanda). La muestra de tierra fue tomada en una zona cercana a una fumarola azufrada y por tanto con gran cantidad de sulfuros metálicos de origen natural. Los manantiales geotermiales (por ejemplo *Champagne Pool*) de la zona y sus alrededores son ricos en As, Sb, Au, Ag, H_2S , CO_2 y otros metales como Cr, Li y Na (Pope *et al.* 2004). Por todo ello es lógico que esta muestra presente un alto contenido en metales de origen natural, que induce la expresión de luciferasa del biosensor.

Otras muestras con contaminación por metales (conocida a priori) también indujeron

la respuesta del biosensor, como las correspondientes a dos suelos agrícolas de la zona de Aznalcóllar (Sevilla), recogidas tras el vertido de metales que tuvo lugar en abril de 1998. Las muestras fueron tomadas tras el accidente ecológico, y a juzgar por la respuesta del biosensor las muestras continúan presentando metales en forma biodisponible once años más tarde, lo que refleja la gran persistencia de los metales pesados (Hill 2004) y la gravedad de aquel desastre ecológico.

Para evaluar la presencia de metales biodisponibles en todas las muestras de suelo analizadas, los biosensores fueron expuestos a una suspensión acuosa (H_2O milliQ) de la muestra. De este modo, la inducción de expresión en el biosensor reflejó la potencial transferencia del metal del suelo a la fase acuosa. Varios trabajos han demostrado que sólo un bajo porcentaje ($<1\%$) es extraíble por agua (Kahru *et al.* 2005; Bondarenko *et al.* 2008), por lo que los extractos no son tóxicos para el biosensor. Otros autores realizan también una extracción con ácido acético (Kahru *et al.* 2005) que tiene mayor capacidad de extraer los iones metálicos. A pesar de esta limitación, el biosensor MTT5Luc puede detectar concentraciones de metal biodisponible no tóxicas en todas las muestras de suelo analizadas.

Para comparar la sensibilidad de los biosensores con los métodos tradicionales se analizaron también ocho muestras de suelo contaminadas por metales (Figura 68), cuyo contenido total de metales había sido previamente determinado por la metodología analítica que establece la Directiva Europea 86/278 (European Council 1986). El contenido total de cada metal de las ocho muestras estaba dentro de los máximos niveles permitidos por la Directiva de la Unión Europea. Sin embargo, todas las muestras excepto una (el sedimento de una laguna de Madrid) produjeron un incremento significativo de la luminiscencia en el biosensor MTT5Luc por encima de los niveles basales (Figura 68). Esto significa que todas las muestras analizadas excepto una contenían metales en forma biodisponible, lo cual es potencialmente tóxico para los seres vivos.

En el sedimento de la laguna de Madrid sólo se había analizado la existencia de Pb. En el supuesto de que todo el Pb se encontrase en forma biodisponible, los biosensores habrían sido expuestos a una concentración de Pb de aproximadamente $1,12 \times 10^{-5}$ M (Tabla A3, Anexo), que según la respuesta de los biosensores en tampón Tris-HCl (apartado C.2.2 de R), produciría una inducción de la luminiscencia de MTT5Luc aproximadamente 50 veces los niveles basales. Como se ha discutido anteriormente, la respuesta de un biosensor es presumiblemente diferente en una muestra natural respecto a la observada en una solución hecha en el laboratorio, debido a la multitud de factores que pueden afectar tanto a la biodisponibilidad del metal como a la respuesta del biosensor (Van der Meer *et al.* 2004). Puesto que la luminiscencia de MTT1Luc y MTT5Luc obtenida es similar a los niveles basales, en la muestra no debe existir ningún tóxico que inhiba la expresión de luciferasa por el biosensor. Por lo tanto, lo más probable es que el Pb presente en el sedimento de la laguna se encuentre en forma no biodisponible, y por ello incapaz de atravesar la membrana citoplasmática de *T. thermophila* e inducir la apertura del promotor Cd-MT.

La legislación medioambiental generalmente determina cuáles son las máximas concentraciones de metales aceptables en el medio, pero considera a los metales de forma individualizada, sin tener en cuenta los tipos de interacción que se pueden establecer entre los distintos metales de una mezcla (Preston *et al.* 2000). Lo más frecuente es que los metales estén presentes en mezclas (Walker *et al.* 2006), como se puede comprobar también a la vista del análisis físico-químico de muestras contaminadas (Figura 68, B).

La toxicidad de las mezclas metálicas se ha hecho especialmente importante en las últimas décadas debido al alarmante incremento de la concentración de metales pesados en suelos, como resultado de la aplicación, con fines agrícolas, de los lodos obtenidos en la depuración de aguas residuales (McGrath 1993; McGrath *et al.* 1999). De hecho, la muestra correspondiente al lodo procedente de una EDAR es la que mayor contenido total de metales presentaba, y la que por tanto provocó el mayor incremento de la expresión de luciferasa en el biosensor MTT5Luc (muestra 4, Figura 68). El incremento de las concentraciones de metales en suelo por este motivo ha resultado en el establecimiento de los niveles máximos permitidos en lodos, con fines agrícolas, por la Unión Europea (European Council 1986). Sin embargo, la legislación actual es insuficiente al pasar por alto la importancia de las interacciones entre metales en el suelo, y diversos especialistas reclaman la necesidad de una nueva regulación (Wallace y Wallace 1994; Preston *et al.* 2000).

En las muestras analizadas deben existir varios tipos de interacción entre los distintos metales que contiene, puesto que los coeficientes de inducción de la expresión de luciferasa de los biosensores son distintos a los esperados según las concentraciones de los distintos metales presentes. No discutiremos aquí qué tipos de interacción se podrían dar, ya que la situación es realmente compleja, al estar presentes hasta siete metales distintos. Como ya se indicó en el apartado C2.2 de R, el tipo de interacción entre dos metales y su efecto sobre la respuesta del biosensor celular depende del tipo de metal y de la concentración de cada uno de ellos, como también se ha observado para otros biosensores celulares (Preston *et al.* 2000). Además, en distintos bioensayos de toxicidad de metales se ha detectado la existencia de los tres tipos posibles de interacción entre metales, dependiendo de cada metal y su concentración, tanto en el ciliado *T. thermophila* (Gallego *et al.* 2007) como en organismos pluricelulares (Fargasova 2001; An *et al.* 2004).

En la muestra 8 (suelo del Oeste de la Península Ibérica) sólo se había determinado el contenido total de Cd (Figura 68, B), y junto a la muestra 7 presenta los menores niveles de Cd. La concentración teórica de Cd presente en la alícuota de la muestra a la que fueron expuestos los biosensores es de 4,64 nM de Cd (Tabla A3, Anexo), concentración que está por debajo del límite de detección para ambos biosensores MTT1Luc y MTT5Luc. Por lo tanto, la luminiscencia de los biosensores debería ser similar a la basal, o algo mayor en el caso de MTT5Luc. Sin embargo, esta muestra produjo un gran incremento en la luminiscencia en ambos biosensores MTT1Luc (12 veces la expresión basal) y MTT5Luc (34 veces). Esta respuesta de los biosensores denuncia la existencia de otros metales pesados en la muestra, que son responsables del mayor

nivel de inducción de la expresión de luciferasa respecto a la esperada para esa concentración de Cd. Además, el pH ácido de este suelo pudo contribuir a que la mayor parte de los metales que contenga se encuentren en forma biodisponible, puesto que a pH ácido los metales se encuentran como especies iónicas libres (Rensing y Maier 2003). Esto también sería aplicable a la muestra 7, que a pesar de que es la que menores niveles de Cd presenta, es una de las tres muestras analizadas que induce la expresión de luciferasa en MTT1Luc (Figura 68, B).

C.6 Los biosensores celulares como sistemas complementarios a la metodología tradicional de evaluación de la contaminación ambiental por metales

Como hemos comprobado, los biosensores celulares desarrollados en este trabajo representan un método sencillo y eficaz para detectar distintos metales pesados en muestras naturales de suelo y agua, incluso a concentraciones inferiores a los máximos niveles establecidos por la legislación ambiental (Tabla 39). Sin embargo, al igual que otros biosensores conocidos, algunas de sus características/parámetros necesitan ser optimizados para su completa validación como sistemas de detección de contaminación por metales pesados.

Metal	Concentración de metal (M) máxima permitida Directiva CEE	Sensibilidad biosensores (M)	
		MTT1Luc	MTT5Luc
Cd	$8,9 \times 10^{-6}$ a $2,7 \times 10^{-5}$	$5-25 \times 10^{-9}$	25×10^{-9}
Cu	$7,9 \times 10^{-4}$ a $2,2 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6}$
Ni	5×10^{-4} a $1,3 \times 10^{-3}$	¿?	¿?
Pb	$2,4 \times 10^{-4}$ a $1,5 \times 10^{-3}$	$0,5 \times 10^{-6}$	50×10^{-9}
Zn	$2,29 \times 10^{-3}$ a $4,6 \times 10^{-3}$	$0,5 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6}$
Hg	5×10^{-6} a $7,5 \times 10^{-6}$	25×10^{-9}	25×10^{-9}
As	(no se especifica)	50×10^{-9}	25×10^{-9}

Tabla 39. Comparación del grado de sensibilidad (concentración mínima de metal para la que se induce el sistema reportero) en la detección de distintos metales pesados que presentan los dos biosensores MTT1Luc y MTT5Luc, respecto a los valores límite de concentración de metales pesados presentes en suelos que establece la Directiva Europea 86/278/CEE. ¿?: No se ha determinado.

A pesar de las limitaciones que presentan estos biosensores celulares, al igual que la mayoría de los biosensores actuales, existen un gran número de razones que les aseguran un futuro prometedor en el campo de la evaluación de la contaminación ambiental. De hecho, algunos han sido ya estandarizados y comercializados bajo distintos nombres (BIOMET®, Corbisier *et al.* 1999). Sin embargo, aunque son utilizados en varios laboratorios europeos, aún no han sido reconocidos por ninguna autoridad legisladora como metodología oficial de cuantificación de biodisponibilidad (Magrisso *et al.* 2008). Tampoco aparecen en el reciente *Framework for Metal Risk Assessment* (Fairbrother *et al.* 2007) publicado por la Agencia de Protección Ambiental estadounidense (US EPA).

Las cepas MTT1Luc y MTT5Luc pueden detectar un amplio rango de metales, con un gran nivel de sensibilidad para muchos de ellos. Además, como hemos demostrado son rápidos y sencillos de utilizar, y sobre todo muy económicos. La legislación establece que los niveles de

metales en agua tienen que ser determinados por métodos físico-químicos (ICP-MS, ICP-AES GHAA, GFAA, ASV). El coste de cada muestra analizada por estas metodologías es de aproximadamente 10-50 \$ (Roberto *et al.* 2002). Además el coste de los aparatos es de 30.000-200.000 \$ por instrumento, dependiendo de la técnica (Roberto *et al.* 2002). En cambio, la determinación empleando biosensores celulares es significativamente mucho más económica. Por ejemplo, aplicando las cepas MTT1Luc o MTT5Luc, el coste aproximado para nuestro laboratorio fue de 0,8 €/muestra. La muestra prácticamente no necesita ser procesada, y el coste del luminómetro necesario para la lectura de bioluminiscencia no supera los 1.500 €.

La detección de metales biodisponibles en muestras naturales mediante biosensores celulares, no tiene por qué reemplazar las metodologías analíticas tradicionales, sino que puede complementarlas, puesto que los biosensores son capaces de diferenciar la fracción biodisponible del contenido total de metales de la muestra. Tal información es crucial para determinar el riesgo (de toxicidad) potencial o real, y posteriormente la elección del método de bioremediación más adecuado (Liao *et al.* 2006).

El verdadero valor de los biosensores celulares no es su aplicación ambiental en solitario (sustituyendo a los métodos físico-químicos), sino en combinación con un tipo de análisis determinado (Harkins *et al.* 2004). Según nuestra opinión, más importante que lograr una altísima sensibilidad/especificidad es conseguir que el biosensor pueda ser aplicado directamente a la muestra natural. El biosensor celular podría ser utilizado como un “primer filtro” de detección de metales, estableciendo áreas de atención (tratamiento/evaluación) prioritaria o descartándolas. Así, el biosensor reduciría enormemente el coste global del análisis cuando se tienen que analizar un gran número de muestras. Con relación a esto, otra importante aplicación de los biosensores celulares podría ser el seguimiento de la evolución de un determinado proceso de biorremedio en curso.

Además, comparando la medida obtenida del biosensor con la del contenido total de metales (análisis químico) se podría determinar si tras un cambio ambiental (disminución del pH, etc.), se ha incrementado la fracción biodisponible de los metales presentes en la muestra. Una limitación respecto a este punto, es la incapacidad del biosensor de distinguir entre varios metales, aunque esto se podría compensar utilizando distintos biosensores en paralelo con distintas especificidades.

C.7 Validación de las cepas MTT1Luc y MTT5Luc como biosensores celulares para la detección de metales. Etapas concluidas y aspectos por mejorar

Más allá de las ventajas de los biosensores sobre los métodos físico-químicos (apartado C.5 de I), si se quiere conseguir su comercialización y aceptación por las autoridades legisladoras, se tiene que conseguir que esta nueva metodología de evaluación de contaminación ambiental sea comparable a las metodologías tradicionales en términos de sensibilidad, fiabilidad, selectividad, reproducibilidad, etc.

La validación de cualquier biosensor conlleva un laborioso trabajo con multitud de análisis encaminados a detectar y corregir las “debilidades” del biosensor, de modo que se consiga optimizar y estandarizar la respuesta. Aunque hay varios procedimientos establecidos para la validación de métodos cuantitativos, no los hay para la validación de los cualitativos (como es el caso que aquí se presenta). Por ello algunos autores (Thevenot *et al.* 2001) han propuesto que la validación de los biosensores se realice en base a distintos parámetros analíticos. Los más importantes son la especificidad, sensibilidad, reproducibilidad, estabilidad, mantenimiento, la necesidad de un procesamiento previo de las muestras y su aplicación directa a muestras naturales (Rodríguez-Mozaz *et al.* 2006). Muchos de ellos han sido analizados en este trabajo de investigación, y representan excelentes argumentos para utilizar *Tetrahymena* como biosensor celular de metales pesados.

En general, la sensibilidad de los biosensores MTT1Luc y MTT5Luc es bastante alta, siendo capaces de detectar distintos metales de relevancia ecotoxicológica a concentraciones del orden de μM -nM. Aunque algunos biosensores procariotas son capaces de detectar concentraciones inferiores, las cepas MTT1Luc y MTT5Luc se encuentran entre los cinco biosensores celulares descritos más sensibles para muchos metales. Además, son los biosensores celulares eucariotas capaces de detectar las menores concentraciones de metales pesados (Tabla 38), muy por debajo incluso de los máximos niveles permitidos por la legislación ambiental (European Council 1986).

Una vez dentro de la célula el metal interactuará con la proteína/s reguladora/s (actualmente desconocida/s en *Tetrahymena*) que activará/n la expresión de luciferasa vía el promotor de *MTT1* o *MTT5*. Sin embargo, en el citoplasma parte del metal puede ser inmovilizado o quelado por diferentes moléculas, tales como el GSH o las apoMTs preexistentes (dado su expresión constitutiva) o expulsado al exterior (dado el gran número de genes que codifican bombas para iones metálicos presentes en el genoma de *T. thermophila*, apartado A.5.1 de I), antes de que interactúe con la/s proteína/s reguladora/s que abrirá/n el promotor MT del biosensor. Aunque esto aún no ha sido analizado, parece lógico pensar que la actuación de los mecanismos celulares de detoxificación del metal (probablemente expulsión y bioacumulación en *Tetrahymena*) compitan en cierto modo con la inducción de la respuesta del biosensor, disminuyendo su sensibilidad o incrementando la concentración de metal mínima detectable. Por tanto, y si estas consideraciones son correctas, la sensibilidad del biosensor se podría incrementar aumentando la permeabilidad celular a metales, por ejemplo potenciando la expresión de los transportadores de membrana utilizados por los iones metálicos para entrar en la célula. O también, como ya se ha realizado en otros sistemas, se podría actuar a nivel de los mecanismos de detoxificación celular. Por ejemplo, se ha comprobado que los biosensores procariotas para Hg^{2+} basados en la proteína reguladora MerR, detectan concentraciones de Hg 20 veces menores que cuando no expresan además la reductasa MerA (que convierte Hg^{2+} en Hg^0 que es volátil) (Rodríguez-Mozaz *et al.* 2006).

El conocimiento de las bases moleculares de los mecanismos de adquisición y detoxi-

ficación de metales presentes en *Tetrahymena*, sin duda proporcionará nuevas bases de actuación para la mejora de los futuros biosensores celulares de metales basados en este ciliado. Si finalmente conseguimos identificar la/s proteína/s que interaccionan con el motivo MTCM1 de los promotores *MTT1* y *MTT5*, ésta podría ser una importante diana de actuación para optimizar la respuesta de los biosensores.

Puesto que la expresión de MTs en *Tetrahymena* es inducida por una gran variedad de agentes estresantes ambientales, es lógico pensar que la respuesta del biosensor pueda ser inducida igualmente por diversos agentes estresantes ambientales. De momento, y en las condiciones experimentales establecidas, parece que responden únicamente a la presencia de un amplio espectro de metales pesados. No obstante, el hecho de que las cepas MTT1Luc y MTT5Luc no sean específicas para un solo metal no tiene por qué ser una desventaja. Dado que lo más frecuente es que los vertidos de metales comprendan más de un metal (Fairbrother *et al.* 2007), parece más importante saber cómo de tóxica es la muestra que determinar específicamente qué metales contiene.

Estos biosensores podrían utilizarse como un sistema de análisis para la detección de metales biodisponibles en una muestra. Se puede combinar además la capacidad de *Tetrahymena* como biosensor de metales con su utilidad como microorganismo bioindicador de toxicidad demostrada por distintos investigadores (Nilsson 1989; Dayeh *et al.* 2005; Gallego *et al.* 2007). *Tetrahymena* como protozoo ciliado representa además uno de los primeros niveles de la cadena trófica, por lo que es interesante como sistema de alerta temprana de contaminación. Y esto, en el caso de los metales es especialmente importante, puesto que como se ha demostrado estos contaminantes inorgánicos pueden sufrir un proceso de bioacumulación durante la cadena trófica (Kong *et al.* 1995; Chang *et al.* 1996; Seebabaugh *et al.* 2005).

Pese a la existencia de cierta variabilidad en el nivel de inducción, el patrón de la respuesta de los biosensores es siempre el mismo, y su reproducibilidad ha quedado demostrada mediante los experimentos de ensayo ciego. Los posibles falsos negativos son fácilmente identificables gracias al cierto nivel de expresión basal del promotor MT que regula la expresión del gen luciferasa, como ya se comentó anteriormente. También se ha propuesto un sistema para evitar falsos positivos, mediante la adición a la muestra de agentes quelantes de metales.

La estabilidad de las dos cepas (MTT1Luc y MTT5Luc) es otro de los parámetros totalmente optimizados. Muchas de las construcciones empleadas en biosensores procariotas han sido introducidas en la célula dentro de un plásmido en alto número de copias (Rensing y Maier 2003; van der Meer *et al.* 2004), por lo que son menos aconsejables para estudios a largo plazo. La disminución del número de copias e incluso la pérdida de las construcciones afectarán evidentemente a la respuesta de los biosensores variando su sensibilidad. Por el contrario, las cepas MTT1Luc y MTT5Luc representan dos líneas recombinantes clonales estables, cuya construcción reportera ha sido integrada en el locus macronuclear *btu1-1*, por lo que se mantienen de forma indefinida.

Otros aspectos ya optimizados son el fácil mantenimiento de los biosensores y el rápi-

do tiempo de respuesta (< 2 h). Varios investigadores han mostrado que la expresión de MTs de *Tetrahymena* se induce muy rápidamente, tras la exposición de la célula a metales, incluso a los 30 minutos (Dondero *et al.* 2004). Según nuestros análisis, el tiempo óptimo de exposición a la muestra para lograr los mejores límites de detección de metales es de 2 horas. La mayoría de los bioensayos en los que se emplean biosensores celulares son rápidos, con tiempos de exposición al metal e inducción de la respuesta entre 30-180 minutos, aunque también hay algunos biosensores que requieren tiempos más prolongados (Scott *et al.* 1997; Tibazarwa *et al.* 2001; Tom-Petersen *et al.* 2001; Hakkila *et al.* 2002) (Tablas 37 y 38).

Además de ser los biosensores eucariotas capaces de detectar las concentraciones de metales más bajas, *T. thermophila* necesita los menores tiempos de exposición a la muestra (2 h), al igual que los biosensores celulares construidos con levaduras. Por el contrario, las cepas de *C. elegans* necesitan tiempos de inducción superiores (7-24 horas) y aún así su sensibilidad de detección es menor que la de *T. thermophila* y levaduras (*S. cerevisiae* y *H. polymorpha*). Sólo la cepa de *C. elegans* transgénica construida por Cioci *et al.* (2000) detecta menores concentraciones de Cd y Hg que las dos de levaduras y la cepa GFPMTT5 de *T. thermophila*, pero necesita un tiempo de exposición a la muestra de 24 horas. En cualquier caso, esta cepa no es capaz de detectar menores concentraciones de metales que los biosensores MTT1Luc y MTT5Luc para ninguno de los metales analizados (Tabla 38).

A lo largo de esta última sección de la tesis doctoral hemos mostrado que las cepas MTT1Luc o MTT5Luc de *T. thermophila* se pueden utilizar en muestras naturales, tanto de origen terrestre como acuático. No se requiere un procesamiento previo complejo de las muestras, basta con una etapa de centrifugación y filtración. El sustrato D-luciferina penetra fácilmente en la célula sin necesidad de que ésta tenga que ser permeabilizada previamente, al contrario que en otros biosensores eucariotas (*S. cerevisiae*, *H. polymorpha*, *C. elegans*). No obstante, aún queda trabajo por hacer para una completa validación y estandarización de estos biosensores celulares. En una próxima fase habría que aplicar el biosensor a una mayor variedad de muestras naturales con contaminación conocida por metales, y sin contaminación. Los biosensores deberían ser ensayados además con soluciones certificadas de referencia, y por distintos laboratorios. Todo ello con la intención de la estandarización y validación de estos biosensores celulares por procedimientos internacionalmente reconocidos (ISO, AOAC, etc.).

Conclusiones

A. Sobre las metalotioneínas de *Tetrahymena*

1. Las metalotioneínas de *Tetrahymena* se pueden dividir en dos subfamilias, 7a (Cd-MTs) y 7b (Cu-MTs), distinguibles principalmente por las características estructurales de sus secuencias aminoacídicas y el grado de inducción de los genes que las codifican por Cd o Cu. El análisis filogenético de las once MTs descritas en *Tetrahymena* corrobora su clasificación en estas dos subfamilias.

2. Las Cd-MTs (subfamilia 7a) de *Tetrahymena* comparten una marcada estructura modular que podría haber contribuido al inusual tamaño de estas MTs, superior respecto a las MTs del resto de organismos. La estructura modular ha inspirado la elaboración de un posible modelo de la historia evolutiva de estas Cd-MTs, basado extensamente en duplicaciones génicas.

3. La expresión de los genes MT de *T. thermophila* y *T. rostrata* se induce significativamente tanto en presencia de metales como de otros agentes estresantes (pH ácido, alta temperatura, estrés oxidativo e inanición), lo que confirma el carácter multiestrés de las MTs de *Tetrahymena*, como sucede también en otros organismos.

4. Las tres isoformas génicas de Cd-MTs de *T. thermophila* (*MTT1*, *MTT3* y *MTT5*) presentan patrones de inducción y niveles de expresión diferentes. En general e independientemente del agente inductor utilizado, el orden en los niveles de expresión es *TtheMTT5* >> *TtheMTT1* > *TtheMTT3*, siendo *TtheMTT5* el gen más inducible de los tres y el que responde a un mayor número de condiciones diferentes de estrés. La fuerza del promotor del gen *TtheMTT5* es considerablemente superior a la de *TtheMTT1*, lo que ha quedado demostrado mediante distintas metodologías (RT-PCR cuantitativa o ensayos de actividad luciferasa).

5. El dominio conservado MTCM1 presente (en varias copias) en los promotores de los genes Cd-MTs de *T. thermophila* (P_{MTT5} :13 copias \gg P_{MTT1} :6 copias $>$ P_{MTT3} :2 copias), interacciona con una o varias proteínas presentes en extractos macronucleares de este ciliado. Diversos hechos experimentales junto con el análisis bioinformático, avalan la implicación de este motivo en la regulación de la expresión de los genes de Cd-MTs de *Tetrahymena*.

6. La existencia de varias moléculas de ADNc del gen *TtheMTT5*, aisladas de distintas genotecas de expresión, que mantienen o han eliminado el intrón de 63 pb localizado en la región 3'UTR, podría significar el primer caso de procesamiento alternativo de intrones en *T. thermophila*. Dado que el intrón incluye en su secuencia dos señales putativas de degradación de ARNm y secuencias invertidas complementarias que *in silico* pueden formar horquillas, se podría pensar que el significado biológico de tal procesamiento alternativo probablemente sea regular la localización intracelular o la vida media de los transcritos *TtheMTT5*.

7. Atendiendo a los resultados obtenidos relacionados con la localización intracelular de los complejos metal-MTs, podemos concluir que en *T. thermophila* los complejos Cd-MT no se acumulan en vacuolas, o al menos no en las condiciones experimentales ensayadas, a diferencia de lo que ocurre en otros ciliados. Estos resultados coinciden con el hecho de que las proteínas de fusión GFP::MTT1 y GFP::MTT5 se localicen por todo el citoplasma de la célula, incluso tras 24 horas de exposición a Cd.

B. Sobre la pseudofitoquelatín sintasa de *Tetrahymena thermophila*

8. El gen *TtΨPCS* de *T. thermophila* y su proteína inferida presentan características similares a las típicas fitoquelatín sintasas de otros organismos, y su expresión se induce tras una exposición corta a Cd. Sin embargo, no se ha detectado la presencia de fitoquelatinas en los extractos celulares mediante diversos métodos. Por el contrario, la detección de derivados de GSH (Gys-Gly y γ Glu-Cys) en extractos celulares expuestos a Cd, sugiere que la enzima *TtΨPCS* podría estar implicada en el catabolismo del GSH en lugar de la biosíntesis de fitoquelatinas.

9. Tanto la falta de capacidad biosintética de fitoquelatinas por la enzima *TtΨPCS*, junto con su posición en el árbol filogenético de las fitoquelatín sintasas, sugiere que las pseudofitoquelatín sintasas de ciliados (*TtΨPCS* y probablemente *PtPCS*) podrían representar una forma intermedia entre las fitoquelatín sintasas primitivas de procariotas y las de eucariotas superiores.

C. Sobre las cepas recombinantes de *T. thermophila* como biosensores celulares para la detección de metales pesados

10. Las cepas MTT1Luc y MTT5Luc constituyen biosensores celulares más eficaces para la detección de metales pesados que las cepas GFPMTT1 y GFPMTT5, las cuales también podrían ser utilizadas como biosensores celulares. El elevado nivel de sensibilidad en la detección de metales pesados biodisponibles, convierte a las cepas MTT1Luc y MTT5Luc en los biosensores celulares eucariotas capaces de detectar las menores concentraciones de metales pesados no esenciales, y los sitúan entre los cinco biosensores celulares (procariotas o eucariotas) descritos actualmente con mayor sensibilidad para diversos metales de relevancia en contaminación ambiental.

11. Los promotores P_{MTT1} o P_{MTT5} de las construcciones reporteras ($P_{MTT1}::lucFF$ y $P_{MTT5}::lucFF$) integradas en el locus *btu1-1*, se comportan de forma similar a los P_{MTT1} y P_{MTT5} situados en los loci macronucleares *mtt1* y *mtt5* respectivamente, por lo que la expresión de las construcciones reporteras en estas cepas puede ser utilizada para evaluar la presencia de metales pesados.

12. La utilidad de los biosensores MTT1Luc y MTT5Luc ha quedado demostrada mediante su aplicación sobre muestras naturales de distinta naturaleza y origen (acuático o terrestre). A pesar de la existencia de cierta variabilidad intrínseca, la reproducibilidad de la respuesta ha sido puesta de manifiesto mediante los experimentos de ensayo ciego, e igualmente, los posibles resultados falsos negativos pueden ser fácilmente identificables gracias a la existencia de cierto nivel de expresión basal de la construcción reportera. Aunque el proceso de validación aún no ha sido completamente finalizado, la gran variedad de aspectos que han sido ya analizados y optimizados en los biosensores MTT1Luc y MTT5Luc, hacen que podamos concluir que estas cepas recombinantes obtenidas de *T. thermophila* puedan ser consideradas como excelentes biosensores celulares para la detección de metales pesados biodisponibles en muestras naturales contaminadas.

Bibliografía

- Abascal, F., Zardoya, R y Posada, D. 2005. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*, **21**:2104-2105.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **25**:3389-33402.
- Amaro, F., del Pilar de Lucas, M., Martín-González, A. y Gutiérrez, J. C. 2008. Two new members of the *Tetrahymena* multi-stress-inducible metallothionein family: characterization and expression analysis of *T. rostrata* Cd/Cu metallothionein genes. *Gene*, **423**:85-91.
- Amaro, F., Díaz, S., Martín-González, A., Hamilton, E. P. y Orias, E. 2005. A new member of the multi-stress-inducible metallothionein family in *Tetrahymena thermophila*. *FASEB Summer Research conferences. Ciliate Molecular Biology*. Lucca, Toscana, Italia.
- Amiard, J. C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J. y Rainbow, P. S. 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat Toxicol*, **76**:160-202.
- An, Y. J., Kim, Y. M., Kwon, T. I. y Jeong, S. W. 2004. Combined effect of copper, cadmium, and lead upon *Cucumis sativus* growth and bioaccumulation. *Sci Total Environ*, **326**:85-93.
- Andersen, J. B., Sternberg, C., Poulsen, L. K., Bjorn, S. P., Givskov, M. y Molin, S. 1998. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl Environ Microbiol*, **64**:2240-2246.
- Andrews, G. K. 2000. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem Pharmacol*, **59**:95-104.
- Applied Biosystems. 1997. User Bulletin nº 2: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System.
- Applied Biosystems. 2008. Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR.

Bibliografía

- Arnaiz, O., Cain, S., Cohen, J. y Sperling, L. 2007. ParameciumDB: a community resource that integrates the *Paramecium tetraurelia* genome sequence with genetic data. *Nucleic Acids Res*, **35**:D439-444.
- Aruoja, V., Kurvet, I., Dubourguier, H. C. y Kahru, A. 2004. Toxicity testing of heavy-metal-polluted soils with algae *Selenastrum capricornutum*: a soil suspension assay. *Environ Toxicol*, **19**:396-402.
- Asai, D. J. y Forney, J. D. 2000. Methods in Cell Biology: *Tetrahymena thermophila*. Academic Press, San Diego. p. XVIII, 580 p., 3 h. de lam.
- Atrian, S. 2009. Metallothioneins in Diptera. En: *Metallothioneins and Related Chelators*. Sigel, A., Sigel, H. y Sigel, R. K. O. (eds.) RSC Publishing, Cambridge. **5**:155-181.
- ATSDR. 2004. Evaluation of the Toxicology of Chemical Mixtures Commonly Found at Hazardous Waste Sites. IN Service, US Department of Human Services. US Public Health Service. (Ed.) Atlanta, GA, USA.
- Auf der Maur, A., Belser, T., Elgar, G., Georgiev, O. y Schaffner, W. 1999. Characterization of the transcription factor MTF-1 from the Japanese pufferfish (*Fugu rubripes*) reveals evolutionary conservation of heavy metal stress response. *Biol Chem*, **380**:175-185.
- Avilés, C., Torres-Márquez, M. E., Mendoza-Cózatl, D. y Moreno-Sánchez, R. 2005. Time-course development of the Cd²⁺ hyper-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. *Arch Microbiol*, **184**:83-92.
- Bailey, T. L. y Elkan, C. 1994. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, **2**:28-36.
- Bakshandeh, A., Hamilton, E. P. y Orias, E. 2004. Two Adjacent Genes Encoding Cooper-Induced Type Metallothioneins in *Tetrahymena thermophila* May Have Resulted from a Relatively Recent Gene Duplication. *Society of Protozoologists 56th Annual Meeting*. Smithfield, Rhode Island, USA.
- Barchetta, S., La Terza, A., Ballarini, P., Pucciarelli, S. y Miceli, C. 2008. Combination of two regulatory elements in the *Tetrahymena thermophila* HSP70-1 gene controls heat shock activation. *Eukaryot Cell*, **7**:379-386.
- Barchetta, S., La Terza, A., Buonanno, F., Ballarini, P. y Miceli, C. 2005. *Tetrahymena thermophila* whole cell biosensor for environmental biomonitoring. *Society of Protozoologists 56th Annual Meeting*. Smithfield, Rhode Island, USA.
- Barkay, T., Gillman, M. y Turner, R. R. 1997. Effects of dissolved organic carbon and salinity on bioavailability of mercury. *Appl Environ Microbiol*, **63**:4267-4271.
- Baronian, K. H. R. 2004. The use of yeast and moulds as sensing elements in biosensors. *Biosens Bioelectron*, **19**:953-962.

- Barrocas, P. G. R. 2004. Assessment of mercury (II) species bioavailability using a bioluminescent bacterial biosensor. Tesis Doctoral - *The Florida State University College of Arts and Sciences*. Florida, USA.
- Bauman, J. W., Madhu, C., McKim, J. M., Jr., Liu, Y. y Klaassen, C. D. 1992. Induction of hepatic metallothionein by paraquat. *Toxicol Appl Pharmacol*, **117**:233-241.
- Beck, A., Lendzian, K., Oven, M., Christmann, A. y Grill, E. 2003. Phytochelatin synthase catalyzes key step in turnover of glutathione conjugates. *Phytochemistry*, **62**:423-431.
- Belkin, S. 1998. A panel of stress-responsive luminous bacteria for monitoring wastewater toxicity. *Methods Mol Biol*, **102**:247-258.
- Belkin, S. 2003. Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants. *Curr Opin Microbiol*, **6**:206-212.
- Bertin, G. y Averbek, D. 2006. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie*, **88**:1549-1559.
- Bilecen, K., Ozturk, U. H., Duru, A. D., Sutlu, T., Petoukhov, M. V., Svergun, D. I., Koch, M. H., Sezerman, U. O., Cakmak, I. y Sayers, Z. 2005. *Triticum durum* metallothionein. Isolation of the gene and structural characterization of the protein using solution scattering and molecular modeling. *J Biol Chem*, **280**:13701-13711.
- Binz, P. A. y Kägi, J. H. R. 1999. Metallothionein: Molecular evolution and classification. En: *Metallothionein IV*. Klaassen, C. (ed.). Birkhäuser, Verlag., Basel. 7-13.
- Blackburn, E. H. y Gall, J. G. 1978. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol*, **120**:33-53.
- Blindauer, C. A. 2008. Metallothioneins with unusual residues: histidines as modulators of zinc affinity and reactivity. *J Inorg Biochem*, **102**:507-521.
- Blindauer, C. A., Harrison, M. D., Parkinson, J. A., Robinson, A. K., Cavet, J. S., Robinson, N. J. y Sadler, P. J. 2001. A metallothionein containing a zinc finger within a four-metal cluster protects a bacterium from zinc toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**:9593-9598.
- Blum, R., Beck, A., Korte, A., Stengel, A., Letzel, T., Lendzian, K. y Grill, E. 2007. Function of phytochelatin synthase in catabolism of glutathione-conjugates. *Plant J*, **49**:740-749.
- Boldrin, F., Santovito, G., Formigari, A., Bisharyan, Y., Cassidy-Hanley, D., Clark, T. G. y Piccinni, E. 2008. *MTT2*, a copper-inducible metallothionein gene from *Tetrahymena thermophila*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **147**:232-240.
- Boldrin, F., Santovito, G., Gaertig, J., Wloga, D., Cassidy-Hanley, D., Clark, T. G. y Piccinni, E. 2006. Metallothionein gene from *Tetrahymena thermophila* with a copper-inducible-repressible promoter. *Eukaryot Cell*, **5**:422-4225.

- Boldrin, F., Santovito, G., Irato, P. y Piccinni, E. 2002. Metal interaction and regulation of *Tetrahymena pigmentosa* metallothionein genes. *Protist*, **153**:283-291.
- Boldrin, F., Santovito, G., Negrisolo, E. y Piccinni, E. 2003. Cloning and sequencing of four new metallothionein genes from *Tetrahymena thermophila* and *T. pigmentosa*: evolutionary relationships in *Tetrahymena* MT family. *Protist*, **154**:431-442.
- Bondarenko, O., Răpuloa, T., Kahru, A. y Ivask, A. 2008. Bioavailability of Cd, Zn and Hg in Soil to Nine Recombinant Luminescent Metal Sensor Bacteria. *Sensors*, **8**:6899-6923.
- Bourdineaud, J. P., Baudrimont, M., Gonzalez, P. y Moreau, J. L. 2006. Challenging the model for induction of metallothionein gene expression. *Biochimie*, **88**:1787-1792.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**:248-254.
- Brehm-Stecher, B. F. y Johnson, E. A. 2004. Single-cell microbiology: tools, technologies, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev*, **68**:538-559.
- Breierova, E., Vajczikova, I., Sasinkova, V., Stratilova, E., Fisera, I., Gregor, T. y Sajbidor, J. 2002. Biosorption of cadmium ions by different yeast species. *Z Naturforsch C*, **57**:634-639.
- Bridson, E. Y. y Gould, G. W. 2000. Quantal microbiology. *Lett Appl Microbiol*, **30**:95-98.
- Brown, N. L., Stoyanov, J. V., Kidd, S. P. y Hobman, J. L. 2003. The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol Rev*, **27**:145-163.
- Brugnera, E., Georgiev, O., Radtke, F., Heuchel, R., Baker, E., Sutherland, G. R. y Schaffner, W. 1994. Cloning, chromosomal mapping and characterization of the human metal-regulatory transcription factor MTF-1. *Nucleic Acids Res*, **22**:3167-3173.
- Bruins, M. R., Kapil, S. y Oehme, F. W. 2000. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf*, **45**:198-207.
- Brulle, F., Cocquerelle, C., Wamalah, A. N., Morgan, A. J., Kille, P., Lepretre, A. y Vandenbulcke, F. 2008. cDNA cloning and expression analysis of *Eisenia fetida* (Annelida: Oligochaeta) phytochelatin synthase under cadmium exposure. *Ecotoxicol Environ Saf*, **71**:47-55.
- Bruns, P. y D. Cassidy-Hanley. 2000. Biolistic Transformation of Macro- and Micronuclei. En: *Methods ind Cell Biology*, vol 62: *Tetrahymena thermophila*. D. J. Asai y J. D. Forney eds. San Diego, Academic Press. 501-512.
- Bryson, K., McGuffin, L. J., Marsden, R. L., Ward, J. J., Sodhi, J. S. y Jones, D. T. 2005. Protein structure prediction servers at University College London. *Nucleic Acids Res*, **33**:W36-38.
- Bustin, S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, **25**:169-193.
- Calace, N., Petronio, B. M. y Pietroletti, M. 2006. Metal Bioavailability: How does it significance change in the time? *Ann Chim*, **96**:131-136.

- Calderone, V., Dolderer, B., Hartmann, H. J., Echner, H., Luchinat, C., Del Bianco, C., Mangani, S. y Weser, U. 2005. The crystal structure of yeast copper thionein: the solution of a long-lasting enigma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**:51-56.
- Campos, V., Martín-González, A. y Gutiérrez, J. C. (2007) Comparative genomics response to heavy metal stress in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *2nd World Conference of Stress*. Budapest, Hungría.
- Capasso, C., Abugo, O., Tanfani, F., Scire, A., Carginale, V., Scudiero, R., Parisi, E. y D'Auria, S. 2002. Stability and conformational dynamics of metallothioneins from the antarctic fish *Notothenia coriiceps* and mouse. *Proteins*, **46**:259-267.
- Capasso, C., Carginale, V., Scudiero, R., Crescenzi, O., Spadaccini, R., Temussi, P. A. y Parisi, E. 2003. Phylogenetic divergence of fish and mammalian metallothionein: relationships with structural diversification and organismal temperature. *J Mol Evol*, **57 Suppl 1**:S250-257.
- Cazale, A. C. y Clemens, S. 2001. *Arabidopsis thaliana* expresses a second functional phytochelatin synthase. *FEBS Lett*, **507**:215-219.
- Chabanon, H., Mickleburgh, I. y Hesketh, J. 2004. Zipcodes and postage stamps: mRNA localisation signals and their trans-acting binding proteins. *Brief Funct Genomic Proteomic*, **3**:240-256.
- Chang, L. W., Magos, L. y Suzuki, T. 1996. Toxicology of metals. Lewis Publishers : CRC Press, Boca Raton. p. 1198
- Cheung, Pok Lap, A., Kwok Lim Lam, V. y Chan, K. M. 2005. Tilapia metallothionein genes: PCR-cloning and gene expression studies. *Biochim Biophys Acta*, **1731**:191-201.
- Church, H. J., Day, J. P., Braithwaite, R. A. y Brown, S. S. 1993. Binding of lead to a metallothionein-like protein in human erythrocytes. *J Inorg Biochem*, **49**:55-68.
- Cioci, L. K., Qiu, L. y Freedman, J. H. 2000. Transgenic strains of the nematode *Caenorhabditis elegans* as biomonitors of metal contamination. *Environm. Toxicol. Chem.*, **19**:2122-2129.
- Clemens, S. 2006. Evolution and function of phytochelatin synthases. *J Plant Physiol*, **163**:319-332.
- Clemens, S., Kim, E. J., Neumann, D. y Schroeder, J. I. 1999. Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO J*, **18**:3325-33.
- Clemens, S., Schroeder, J. I. y Degenkolb, T. 2001. *Caenorhabditis elegans* expresses a functional phytochelatin synthase. *Eur J Biochem*, **268**:3640-3643.
- Cobbett, C. y Goldsbrough, P. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol*, **53**:159-82.

- Cobbett, C. S. 2000. Phytochelatins and Their Roles in Heavy Metal Detoxification. *Plant Physiol.*, **123**:825-832.
- Cobine, P. A., McKay, R. T., Zangger, K., Dameron, C. T. y Armitage, I. M. 2004. Solution structure of Cu6 metallothionein from the fungus *Neurospora crassa*. *Eur J Biochem*, **271**:4213-4221.
- Collins, K. y Gorovsky, M. A. 2005. *Tetrahymena thermophila*. *Curr Biol*, **15**:R317-318.
- Coppellotti, O. 1994. Effects of cadmium on *Uronema marium* (Ciliophora, Scuticociliatida) from Antarctica. *Acta Protozoologica*, **33**:159-167.
- Corbisier, P., van der Lelie, D., Borremans, B., Provoost, A., de Lorenzo, V., Brown, N. L., Lloyd, J. R., Hobman, J. L., Csöregi, E., Johansson, G. y Mattiasson, B. 1999. Whole cell- and protein-based biosensors for the detection of bioavailable heavy metals in environmental samples. *Anal Chim Acta*, **387**:235-244.
- Cousins, R. J. 1985. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol Rev*, **65**:238-309.
- Coyle, P., Philcox, J. C., Carey, L. C. y Roife, A. M. 2002. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci*, **59**:627-647.
- Coyne, R. S., Thiagarajan, M., Jones, K. M., Wortman, J. R., Tallon, L. J., Haas, B. J., Cassidy-Hanley, D. M., Wiley, E. A., Smith, J. J., Collins, K., Lee, S. R., Couvillion, M. T., Liu, Y., Garg, J., Pearlman, R. E., Hamilton, E. P., Orias, E., Eisen, J. A. y Methe, B. A. 2008. Refined annotation and assembly of the *Tetrahymena thermophila* genome sequence through EST analysis, comparative genomic hybridization, and targeted gap closure. *BMC Genomics*, **9**:562.
- Crist, R. H., Oberholser, K., Shang, N. y RNguyen, M. 1981. Nature of binding between metallic ions and algal cell walls. *Environm. Sci. Technol.*, **15**:1212-1217.
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M. y Brenner, S. E. 2004. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res*, **14**:1188-1190.
- Cui, X. y Okayasu, R. 2008. Arsenic accumulation, elimination, and interaction with copper, zinc and manganese in liver and kidney of rats. *Food Chem Toxicol*, **46**:3646-3650.
- D'Souza, S. F. 2001. Microbial biosensors. *Biosens Bioelectron*, **16**:337-353.
- Dalton, T., Paria, B. C., Fernando, L. P., Huet-Hudson, Y. M., Dey, S. K. y Andrews, G. K. 1997. Activation of the chicken metallothionein promoter by metals and oxidative stress in cultured cells and transgenic mice. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **116**:75-86.
- Dallinger, R., Berger, B., Gruber, C., Hunziker, P. y Sturzenbaum, S. 2000. Metallothioneins in terrestrial invertebrates: structural aspects, biological significance and implications for their use as biomarkers. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **46**:331-346.
- Davey, H. M. y Kell, D. B. 1996. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiol Rev*, **60**:641-96.

- Davis, S. R. y Cousins, R. J. 2000. Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. *J Nutr*, **130**:1085-8.
- Dayeh, V. R., Lynn, D. H. y Bols, N. C. 2005. Cytotoxicity of metals common in mining effluent to rainbow trout cell lines and to the ciliated protozoan, *Tetrahymena thermophila*. *Toxicol In Vitro*, **19**:399-410.
- De Knecht, J. A., Van Dillen, M., Koevoets, P., Schat, H., Verkleij, J. y Ernst, W. 1994. Phytochelatins in Cadmium-Sensitive and Cadmium-Tolerant *Silene vulgaris* (Chain Length Distribution and Sulfide Incorporation). *Plant Physiol*, **104**:255-261.
- Del Razo, L. M., Quintanilla-Vega, B., Brambila-Colombres, E., Calderón-Aranda, E. S., Manno, M. y Albores, A. 2001. Stress proteins induced by arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol*, **177**:132-148.
- Dentler, W. 2000. Fixation of *Tetrahymena* Cells for Electron Microscopy. *Methods Cell Biol*, **62**:265-80.
- Díaz, S., Amaro, F., Rico, D., Campos, V., Benítez, L., Martín-González, A., Hamilton, E. P., Orias, E. y Gutiérrez, J. C. 2007. *Tetrahymena* metallothioneins fall into two discrete subfamilies. *PLoS ONE*, **2**:e291.
- Díaz, S., Martín-González, A. y Gutiérrez, J. C. 2006. Evaluation of heavy metal acute toxicity and bioaccumulation in soil ciliated protozoa. *Environ Int*, **32**:711-717.
- Díaz, S., Rico, D., Benítez, L., Martín-González, A. y Gutiérrez, J. C. (2005) A new multi-stress-inducible metallothionein gene in *Tetrahymena thermophila*. *FASEB Summer Research Conferences. Ciliate Molecular Biology*. Lucca, Toscana, Italia.
- Díaz, S., Rico, D., Martín-González, A., Hamilton, E. P., Orias, E. y Gutiérrez, J. C. (2003) Remarkable sequence conservation of Cd-inducible metallothionein isoforms across ciliate groups. *4th European Congress of Protistology & 10th European Conference on Ciliate Biology*. San Benedetto del Tronto, Italia.
- Doerder, F. P., Deak, J. C. y Lief, J. H. 1992. Rate of phenotypic assortment in *Tetrahymena thermophila*. *Dev Genet*, **13**:126-132.
- Domenech, J., Bofill, R., Tinti, A., Torreggiani, A., Atrian, S. y Capdevila, M. 2008. Comparative insight into the Zn(II)-, Cd(II)- and Cu(I)-binding features of the protozoan *Tetrahymena pyriformis* MT1 metallothionein. *Biochim Biophys Acta*, **1784**:693-704.
- Dondero, F., Cavaletto, M., Ghezzi, A. R., La Terza, A., Banni, M. y Viarengo, A. 2004. Biochemical characterization and quantitative gene expression analysis of the multi-stress inducible metallothionein from *Tetrahymena thermophila*. *Protist*, **155**:157-168.
- Duffus, J. H. 2002. "Heavy metals" a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, **74**:793-807.

- Dunlop, S. y Chapman, G. 1981. Detoxification of zinc and cadmium by the freshwater protozoan *Tetrahymena pyriformis*. II. Growth experiments and ultrastructural studies on sequestration of heavy metals. *Environment Resear*, **24**:264-274.
- Durrieu, C. y Tran-Minh, C. 2002. Optical algal biosensor using alkaline phosphatase for determination of heavy metals. *Ecotoxicol Environ Saf*, **51**:206-9.
- Egli, D., Domenech, J., Selvaraj, A., Balamurugan, K., Hua, H., Capdevila, M., Georgiev, O., Schaffner, W. y Atrian, S. 2006. The four members of the *Drosophila* metallothionein family exhibit distinct yet overlapping roles in heavy metal homeostasis and detoxification. *Genes Cells*, **11**:647-658.
- Eisen, J. A., Coyne, R. S., Wu, M., Wu, D., Thiagarajan, M., Wortman, J. R., Badger, J. H., Ren, Q., Amedeo, P., Jones, K. M., Tallon, L. J., Delcher, A. L., Salzberg, S. L., Silva, J. C., Haas, B. J., Majoros, W. H., Farzad, M., Carlton, J. M., Smith, R. K., Jr., Garg, J., Pearlman, R. E., Karrer, K. M., Sun, L., Manning, G., Elde, N. C., Turkewitz, A. P., Asai, D. J., Wilkes, D. E., Wang, Y., Cai, H., Collins, K., Stewart, B. A., Lee, S. R., Wilamowska, K., Weinberg, Z., Ruzzo, W. L., Wloga, D., Gaertig, J., Frankel, J., Tsao, C. C., Gorovsky, M. A., Keeling, P. J., Waller, R. F., Patron, N. J., Cherry, J. M., Stover, N. A., Krieger, C. J., del Toro, C., Ryder, H. F., Williamson, S. C., Barbeau, R. A., Hamilton, E. P. y Orias, E. 2006. Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote. *PLoS Biol*, **4**:e286.
- Elowitz, M. B., Levine, A. J., Siggia, E. D. y Swain, P. S. 2002. Stochastic gene expression in a single cell. *Science*, **297**:1183-1186.
- Erbe, J. L., Adams, A. C., Taylor, K. B. y Hall, L. M. 1996. Cyanobacteria carrying an *smt-lux* transcriptional fusion as biosensors for the detection of heavy metal cations. *J Ind Microbiol*, **17**:80-83.
- Erk, M. y Raspor, B. 2001. Interference of Pb leaching from the pH electrode on Cd-metallothionein complex. *Anal Chim Acta*, **422**:165-170.
- Estruch, F. 2000. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev*, **24**:469-486.
- European Council. 1986. The protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture. Official Journal of the European Union (Ed.).
- Fairbrother, A., Wenstel, R., Sappington, K. y Wood, W. 2007. Framework for metals risk assessment. *Ecotoxicol Environ Saf*, **68**:145-227.
- Fargasova, A. 2001. Winter third- to fourth-instar larvae of *Chironomus plumosus* as bioassay tools for assessment of acute toxicity of metals and their binary combinations. *Ecotoxicol Environ Saf*, **48**:1-5.
- Felsenstein, J. 1989. PHYLIP -- Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*, **5**:164-166.
- Felsenstein, J. 2004. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.

- Fowler, B. A., Hildebrand, C. E., Kojima, Y. y Webb, M. 1987. Nomenclature of metallothionein. En: *Metallothionein II*. Kägi, J. H. R. y Kojima, Y. (eds.). Experientia Supplementum. Birkhäuser, Verlag, Basel. 19-22.
- Fu, C. y Miao, W. 2006. Cloning and characterization of a new multi-stress inducible metallothionein gene in *Tetrahymena pyriformis*. *Protist*, **157**:193-203.
- Gadd, G. M. 2000. Heavy metal pollutants: environmental and biotechnological aspects. En: The Encyclopedia of Microbiology. Lederberg, J. (ed.). Academic Press, New York. **2**:607-617.
- Gaertig, J., Thatcher, T. H., Gu, L. y Gorovsky, M. A. 1994. Electroporation-mediated replacement of a positively and negatively selectable beta-tubulin gene in *Tetrahymena thermophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**:4549-4553.
- Gaertig, J. y Kapler, G. 2000. Transient and Stable DNA Transformation of *Tetrahymena thermophila* by Electroporation. En: Methods in Cell Biology, vol 62: *Tetrahymena thermophila*. D. J. Asai y J. D. Forney eds. San Diego, Academic Press. 486-500.
- Gallego, A., Martín-González, A., Ortega, R. y Gutiérrez, J. C. 2007. Flow cytometry assessment of cytotoxicity and reactive oxygen species generation by single and binary mixtures of cadmium, zinc and copper on populations of the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila*. *Chemosphere*, **68**:647-661.
- Ganguly, S., Taioli, E., Baranski, B., Cohen, B., Toniolo, P. y Garte, S. J. 1996. Human metallothionein gene expression determined by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction as a biomarker of Cd exposure. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **5**:297-301.
- Gasic, K. y Korban, S. S. 2007. Transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*) plants expressing an *Arabidopsis* phytochelatin synthase (AtPCS1) exhibit enhanced As and Cd tolerance. *Plant Mol Biol*, **64**:361-369.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. y Oliver, S. G. 1996. Life with 6000 genes. *Science*, **274**:563-567.
- Golding, G. R., Kelly, C. A., Sparling, R., Loewen, P. C., Rud, W. M. J. y Barkay, T. 2002. Evidence for facilitated uptake of Hg(II) by *Vibrio anguillarum* and *Escherichia coli* under anaerobic and aerobic conditions. *Limnol Oceanogr*, **47**:967-975.
- González-Mendoza, D., Moreno, A. Q. y Zapata-Pérez, O. 2007. Coordinated responses of phytochelatin synthase and metallothionein genes in black mangrove, *Avicennia germinans*, exposed to cadmium and copper. *Aquat Toxicol*, **83**:306-314.
- Greider, C. W. y Blackburn, E. H. 1985. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell*, **43**:405-13.
- Grill, E. 1985. Phytochelatin: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science*:674-676.

- Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E. L. y Zenk, M. H. 1989. Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**:6838-6842.
- Gruber, C., Sturzenbaum, S., Gehrig, P., Sack, R., Hunziker, P., Berger, B. y Dallinger, R. 2000. Isolation and characterization of a self-sufficient one-domain protein. (Cd)-metallothionein from *Eisenia foetida*. *Eur J Biochem*, **267**:573-82.
- Gu, M. B., Mitchell, R. J. y Kim, B. C. 2004. Whole-cell-based biosensors for environmental biomonitoring and application. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, **87**:269-305.
- Guindon, S. y Gascuel, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol*, **52**:696-704.
- Guindon, S., Lethiec, F., Duroux, P. y Gascuel, O. 2005. PHYML Online--a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res*, **33**:W557-559.
- Guo, L., Fu, C. y Miao, W. 2008. Cloning, characterization, and gene expression analysis of a novel cadmium metallothionein gene in *Tetrahymena pigmentosa*. *Gene*: **423**:29-35
- Gutiérrez, J. C. 1985. Microspectrophotometric study and kinetics of autogamy during encystment of *Tetrahymena rostrata*. *Cell Biol Int Rep*, **9**:169-173.
- Gutiérrez, J. C., Amaro, F. y Martín-González, A. 2009. From heavy metal-binders to biosensors - Ciliate metallothioneins discussed. *Bioessays*, **31**:805-816
- Gutiérrez, J. C., Díaz, S., Martín-González, A. y Ortega, R. 2003. Ciliates as a potential source of cellular and molecular biomarkers/biosensors for heavy metal pollution. *European Journal of Protistology*, **39**:461-467.
- Gutiérrez, J. C., Díaz, S., Martín-González, A., Ortega, R., Gallego, A., Amaro, F., Campos, V. y Plana, M. P. 2006. Ciliates as potential biosensors for heavy metal pollution. En: *Modern Multidisciplinary Applied Microbiology*. Méndez-Vilas, A. (ed.) .726-731.
- Gutiérrez, J. C. y Martín-González, A. 2002. Ciliate encystment-excystment cycle: a response to environmental stress. En: *Microbial development under environmental stress*. Gutiérrez, J. C. (ed.) . Kerala: Research Signpost. 29-49.
- Gutiérrez, J. C., Martín-González, A., Díaz, S., Amaro, F., Ortega, R., Gallego, A. y de Lucas, M. P. 2008. Ciliates as cellular tools to study the eukaryotic cell-heavy metal interactions. En: *Heavy Metal Pollution*. Brown, S. E. y Welton, W. C. (eds.). Nova Science Publishers Inc. 1-45.
- Güven, K., Duce, J. A. y I., D. P. D. 1994. Evaluation of a stress-inducible transgenic nematode strain for rapid aquatic toxicity testing. *Aquat Toxicol*, **20**:119-137.
- Ha, S. B., Smith, A. P., Howden, R., Dietrich, W. M., Bugg, S., O'Connell, M. J., Goldsbrough, P. B. y Cobbett, C. S. 1999. Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell*, **11**:1153-1164.

- Hakkila, K., Maksimow, M., Karp, M. y Virta, M. 2002. Reporter genes *lucFF*, *luxCDABE*, *gfp*, and *dsred* have different characteristics in whole-cell bacterial sensors. *Anal Biochem*, **301**:235-242.
- Hall, J. L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot*, **53**:1-11.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis. *Nucl. Acids. Symp. Ser*, **41**:95-98.
- Hamer, D. H. 1986. Metallothionein. *Annu Rev Biochem*, **55**:913-951.
- Hamilton, E. P. y Orias, E. 2000. Genetically mapping new mutants and cloned genes. *Methods Cell Biol*, **62**:265-280.
- Haq, F., Mahoney, M. y Koropatnick, J. 2003. Signaling events for metallothionein induction. *Mutat Res*, **533**:211-226.
- Harada, E., von Roepenack-Lahaye, E. y Clemens, S. 2004. A cyanobacterial protein with similarity to phytochelatin synthases catalyzes the conversion of glutathione to gamma-glutamylcysteine and lacks phytochelatin synthase activity. *Phytochemistry*, **65**:3179-3185.
- Harkins, M., Porter, A. J. y Paton, G. I. 2004. The role of host organism, transcriptional switches and reporter mechanisms in the performance of Hg-induced biosensors. *J Appl Microbiol*, **97**:1192-1200.
- Harms, H., Wells, M. C. y van der Meer, J. R. 2006. Whole-cell living biosensors--are they ready for environmental application? *Appl Microbiol Biotechnol*, **70**:273-280.
- Haugland, R. P., Gregory, J., Spence, M. T. Z. y Johnson, I. D. 2002. Handbook of fluorescent probes and research products. Molecular Probes, Eugene, OR. p. x, 966 p.
- Heiss, S., Wachter, A., Bogs, J., Cobbett, C. y Rausch, T. 2003. Phytochelatin synthase (PCS) protein is induced in *Brassica juncea* leaves after prolonged Cd exposure. *J. Exp. Bot.*, **54**:1833-1839.
- Hellman, L. M. y Fried, M. G. 2007. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat Protoc*, **2**:1849-61.
- Heuchel, R., Radtke, F., Georgiev, O., Stark, G., Aguet, M. y Schaffner, W. 1994. The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. *EMBO J*, **13**:2870-2875.
- Hill, M. K. 2004. Understanding environmental pollution. Cambridge University Press. p. 486.
- Hindley, J. y Staden, R. 1983. DNA sequencing. Elsevier Biomedical Press. Elsevier Science Pub. Co, Amsterdam. New York. New York, N.Y. p. xi, 384 p.

- Hodson, M. E. 2004. Heavy metals--geochemical bogey men? *Environ Pollut*, **129**:341-343.
- Hollis, R. P., Killham, K. y Glover, L. A. 2000. Design and application of a biosensor for monitoring toxicity of compounds to eukaryotes. *Appl Environ Microbiol*, **66**:1676-1679.
- Huckle, J. W., Morby, A. P., Turner, J. S. y Robinson, N. J. 1993. Isolation of a prokaryotic metallothionein locus and analysis of transcriptional control by trace metal ions. *Mol Microbiol*, **7**:177-187.
- Hughes, M. N. y Poole, R. K. 1991. Metal speciation and microbial growth-the hard (and soft) facts. *J. Gen. Microbiol.*, **137**:725-734.
- Hughes, S. y Sturzenbaum, S. R. 2007. Single and double metallothionein knockout in the nematode *C. elegans* reveals cadmium dependent and independent toxic effects on life history traits. *Environ Pollut*, **145**:395-400.
- Hurst, H. C. 1995. Transcription factors 1: bZIP proteins. *Protein Profile*, **2**:101-168.
- Iftode, F., Cury, J., Fleury, A. y Fryd-Versavel, G. 1985. Action of a heavy ion, Cd^{2+} , and the antagonistic effect of Ca^{2+} , on two ciliates *Tetrahymena pyriformis* and *Euplotes vannus*. *Acta Protozoologica*, **24**:273-279.
- Ikebuchi, H., Teshima, R., Suzuki, K., Terao, T. y Yamane, Y. 1986. Simultaneous induction of Pb-metallothionein-like protein and Zn-thionein in the liver of rats given lead acetate. *Biochem J*, **233**:541-546.
- Imbert, J., Culotta, V., Furst, P., Gedamu, L. y Hamer, D. 1990. Regulation of metallothionein gene transcription by metals. *Adv Inorg Biochem*, **8**:139-164.
- Ivanina, A. V., Taylor, C. y Sokolova, I. M. 2009. Effects of elevated temperature and cadmium exposure on stress protein response in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Aquat Toxicol*, **91**:245-254.
- Ivask, A., Rolova, T. y Kahru, A. 2009. A suite of recombinant luminescent bacterial strains for the quantification of bioavailable heavy metals and toxicity testing. *BMC Biotechnol*, **9**:41.
- Jaillon, O., Bouhouche, K., Gout, J. F., Aury, J. M., Noel, B., Saudemont, B., Nowacki, M., Serrano, V., Porcel, B. M., Segurens, B., Le Mouel, A., Lepere, G., Schachter, V., Betermier, M., Cohen, J., Wincker, P., Sperling, L., Duret, L. y Meyer, E. 2008. Translational control of intron splicing in eukaryotes. *Nature*, **451**:359-362.
- Jeffares, D. C., Penkett, C. J. y Bahler, J. 2008. Rapidly regulated genes are intron poor. *Trends Genet*, **24**:375-378.
- Jenny, M. J., Warr, G. W., Ringwood, A. H., Baltzegar, D. A. y Chapman, R. W. 2006. Regulation of metallothionein genes in the American oyster (*Crassostrea virginica*): ontogeny and differential expression in response to different stressors. *Gene*, **379**:156-165.
- Jones, D. T. 1999. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol*, **292**:195-202.

- Kägi, J. H. 1991. Overview of metallothionein. *Methods Enzymol*, **205**:613-626.
- Kägi, J. H. y Kojima, Y. 1987. Chemistry and biochemistry of metallothionein. *Experientia Suppl*, **52**:25-61.
- Kägi, J. H. y Schaffer, A. 1988. Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry*, **27**:8509-8515.
- Kägi, J. H. y Valee, B. L. 1960. Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J Biol Chem*, **235**:3460-3465.
- Kägi, J. H. R. 1993. Evolution, Structure and Chemical Activity of Class I Metallothioneins: an Overview. En: *Metallothionein III*. Suzuki, K., Imura, N. y Rimura, M. (eds.). Birkhauser-Verlag, Basel. 29-55.
- Kahru, A., Ivask, A., Kasemets, K., Pollumaa, L., Kurvet, I., Francois, M. y Dubourguier, H. C. 2005. Biotests and biosensors in ecotoxicological risk assessment of field soils polluted with zinc, lead, and cadmium. *Environ Toxicol Chem*, **24**:2973-2982.
- Kang, Y. J. 1997. Cellular and molecular mechanisms of metal toxicities. En: *Handbook of Human Toxicology*. Massaro, E. J. (ed.) Boca Ratón, New York 265-284.
- Kappus, H. y Sies, H. 1981. Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia*, **37**:1233-1241.
- Karin, M., Liu, Z. y Zandi, E. 1997. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*, **9**:240-246.
- Kelley, L. A. y Sternberg, M. J. 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc*, **4**:363-371.
- Kelly, E. J., Sandgren, E. P., Brinster, R. L. y Palmiter, R. D. 1997. A pair of adjacent glucocorticoid response elements regulate expression of two mouse metallothionein genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**:10045-100450.
- Kiewiet, A. T. y Ma, W. C. 1991. Effect of pH and calcium on lead and cadmium uptake by earthworms in water. *Ecotoxicol Environ Saf*, **21**:32-37.
- Klaassen, C. D., Choudhuri, S., McKim, J. M., Jr., Lehman-McKeeman, L. D. y Kershaw, W. C. 1994. *In vitro* and *in vivo* studies on the degradation of metallothionein. *Environ Health Perspect*, **102 Suppl 3**:141-146.
- Klaassen, C. D. y Liu, J. 1998. Induction of metallothionein as an adaptive mechanism affecting the magnitude and progression of toxicological injury. *Environ Health Perspect*, **106 Suppl 1**:297-300.
- Klaassen, C. D., Liu, J. y Choudhuri, S. 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **39**:267-294.
- Kneer, R., Kutchan, T. M., Hochberger, A. y Zenk, M. H. 1992. *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* contain heavy metal sequestering phytochelatin. *Arch Microbiol*, **4**:305-310.

- Kohlmeier, S., Mancuso, M., Tecon, R., Harms, H., van der Meer, J. R. y Wells, M. 2007. Bioreporters: *gfp* versus *lux* revisited and single-cell response. *Biosens Bioelectron*, **22**:1578-1585.
- Kondo, N., Imai, K., Isobe, M. y Goto, T. 1984. Cadystin A and B, major unit peptide comprising cadmium binding peptides induced in a fission yeast-separation, revision of structures and synthesis. *Tetrahedron Lett*:3869-3872.
- Kondrashov, F. A. y Kondrashov, A. S. 2006. Role of selection in fixation of gene duplications. *J Theor Biol*, **239**:141-151.
- Kong, I. C., Bitton, G., Koopman, B. y Jung, K. H. 1995. Heavy metal toxicity testing in environmental samples. *Rev Environ Contam Toxicol*, **142**:119-147.
- Koropatnick, J. 1988. Amplification of metallothionein-1 genes in mouse liver cells *in situ*: extra copies are transcriptionally active. *Proc Soc Exp Biol Med*, **188**:287-300.
- Koropatnick, J., Winning, R., Wiese, E., Heschl, M., Gedamu, L. y Duerksen, J. 1985. Acute treatment of mice with cadmium salts results in amplification of the metallothionein-1 gene in liver. *Nucleic Acids Res*, **13**:5423-5439.
- Kovalchuk, I., Titov, V., Hohn, B. y Kovalchuk, O. 2005. Transcriptome profiling reveals similarities and differences in plant responses to cadmium and lead. *Mutat Res*, **570**:149-161.
- Krawczynska, W., Pivovarova, N. N. y Sobota, A. 1989. Effects of cadmium on growth, ultrastructure and content and chemical elements in *Tetrahymena pyriformis* and *Acanthamoeba castellanii*. *Acta Protozoologica*, **28**:245-252.
- Labbé, S., Stewart, G., LaRochelle, O., Poirier, G. G. y Séguin, C. 2001. Identification of Sequence-Specific DNA-Binding Proteins by Southwestern Blotting. En: *Methods in Molecular Biology*, vol. 148: DNA-Protein Interactions Principles and Protocols. Moss, T. (ed.) Humana Press Inc., Totowa. 255-264
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**:680-685.
- Lagido, C., Pettitt, J., Porter, A. J., Paton, G. I. y Glover, L. A. 2001. Development and application of bioluminescent *Caenorhabditis elegans* as multicellular eukaryotic biosensors. *FEBS Lett*, **493**:36-39.
- Larsen, J. 1989. The influence of growth phase and culture conditions of *Tetrahymena* on effects of cadmium. *Toxicology*, **58**:211-223.
- Latchman, D. S. 2008. Eukaryotic transcription factors. Elsevier/Academic Press, Amsterdam; Boston. p. xxviii, 471 p.
- Lee, K. F., Lau, K. M. y Ho, S. M. 1999. Effects of cadmium on metallothionein-I and metallothionein-II mRNA expression in rat ventral, lateral, and dorsal prostatic lobes: quantification by competitive RT-PCR. *Toxicol Appl Pharmacol*, **154**:20-27.

- Lee, S. y Korban, S. S. 2002. Transcriptional regulation of *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase (AtPCS1) by cadmium during early stages of plant development. *Planta*: 689-693.
- Lee, S., Sode, K., Nakanishi, K., Marty, J. L., Tamiya, E. y Karube, I. 1992. A novel microbial sensor using luminous bacteria. *Biosens Bioelectron*, **7**:273-277.
- Lehmann, M., Riedel, K., Adler, K. y Kunze, G. 2000. Amperometric measurement of copper ions with a deputy substrate using a novel *Saccharomyces cerevisiae* sensor. *Biosens Bioelectron*, **15**:211-219.
- Leignel, V., Hardivillier, Y. y Laulier, M. 2005. Small metallothionein MT-10 genes in coastal and hydrothermal mussels. *Mar Biotechnol (NY)*, **7**:236-244.
- Leignel, V., Marchand, J., Moreau, B. y Chenais, B. 2008. Metallothionein genes from hydrothermal crabs (*Bythograeidae, Decapoda*): characterization, sequence analysis, gene expression and comparison with coastal crabs. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **148**:6-13.
- Li, W. H., Yang, J. y Gu, X. 2005. Expression divergence between duplicate genes. *Trends in Genetics*, **21**:602-607.
- Liao, V. H., Chien, M. T., Tseng, Y. Y. y Ou, K. L. 2006. Assessment of heavy metal bioavailability in contaminated sediments and soils using green fluorescent protein-based bacterial biosensors. *Environ Pollut*, **142**:17-23.
- Liao, V. H. y Ou, K. L. 2005. Development and testing of a green fluorescent protein-based bacterial biosensor for measuring bioavailable arsenic in contaminated groundwater samples. *Environ Toxicol Chem*, **24**:1624-1631.
- Liu, J. y Klaassen, C. D. 1996. Absorption and distribution of cadmium in metallothionein-I transgenic mice. *Fundam Appl Toxicol*, **29**:294-300.
- Liu, T., Liu, S., Guan, H., Ma, L., Chen, Z., Gu, H. y Qu, L.-J. 2009. Transcriptional profiling of *Arabidopsis* seedlings in response to heavy metal lead (Pb). *Environ Experiment Bot*, En prensa.
- Liu, X. D. y Thiele, D. J. 1997. Yeast metallothionein gene expression in response to metals and oxidative stress. *Methods*, **11**:289-299.
- Lovley, D. R. 2000. Environmental Microbe-Metal Interactions. ASM Press, Washington.
- Lozupone, C. A., Knight, R. D. y Landweber, L. F. 2001. The molecular basis of nuclear genetic code change in ciliates. *Curr Biol*, **11**:65-74.
- Lu, S., Gu, H., Yuan, X., Wang, X., Wu, A. M., Qu, L. y Liu, J. Y. 2007. The GUS reporter-aided analysis of the promoter activities of a rice metallothionein gene reveals different regulatory regions responsible for tissue-specific and inducible expression in transgenic *Arabidopsis*. *Transgenic Res*, **16**:177-191.

Bibliografía

- Lupas, A., Van Dyke, M. y Stock, J. 1991. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science*, **252**:1162-1164.
- Luporini, P., Alimenti, C., Ortenzi, C. y Vallesi, A. 2005. Ciliate mating types and their specific protein pheromones. *Acta Protozoologica*, **44**:89-101.
- Magrisso, S., Erel, Y. y Belkin, S. 2008. Microbial reporters of metal bioavailability. *Microbial Biotechnology*, **1**:320-330.
- Maier, T., Yu, C., Kullertz, G. y Clemens, S. 2003. Localization and functional characterization of metal-binding sites in phytochelatin synthases. *Planta*, **218**:300-308.
- Mann, H. 1990. Biosorption of heavy metals by bacterial biomass. En: Biosorption of heavy metals Volesky, B. (ed.). CRC Press, Boca Ratón.93-137.
- Margoshes, M. y Vallee, B. L. 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of the American Chemical Society*, **79**:4813-4814.
- Maroni, G., Wise, J., Young, J. E. y Otto, E. 1987. Metallothionein gene duplications and metal tolerance in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **117**:739-744.
- Martín-González, A., Benítez, L., Soto, T., Rodríguez de Lecea, J. y Gutiérrez, J. C. 1997. A rapid bioassay to detect mycotoxins using a melanin precursor overproducer mutant of the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Cell Biol Int*, **21**:213-216.
- Martín-González, A., Borniquel, S., Díaz, S., Ortega, R. y Gutiérrez, J. C. 2005. Ultrastructural alterations in ciliated protozoa under heavy metal exposure. *Cell Biol Int*, **29**:119-126.
- Martín-González, A., Díaz, S., Borniquel, S., Gallego, A. y Gutiérrez, J. C. 2006. Cytotoxicity and bioaccumulation of heavy metals by ciliated protozoa isolated from urban wastewater treatment plants. *Res Microbiol*, **157**:108-118.
- Martín-Platero, A. M., Valdivia, E., Maqueda, M. y Martínez-Bueno, M. 2007. Fast, convenient, and economical method for isolating genomic DNA from lactic acid bacteria using a modification of the protein "salting-out" procedure. *Anal Biochem*, **366**:102-104.
- Mathiessen, P. 2000. Biological effects quality assurance in monitoring programs (BEQUALM) IN CEFAS (Ed.) Burham-on-Crouch, Essex CMO 8HA, UK.
- McGrath, S. P. 1993. Soil quality in relation to agricultural uses. En: Integrated Soil and Sediment Research: A Basis for Proper Protection. Eijackers, H. J. P. y Hamers, T. (eds.) . Kluwer Academic, The Netherlands.187-200.
- McGrath, S. P., Knight, B., Killham, K., Preston, S. y Paton, G. L. 1999. Assessment of the toxicity of metals in soils amended with sewage sludge using a chemical speciation technique and a lux-based biosensor. *Environm. Toxicol. Chem.*, **18**:659-663.
- Mercer, J. F. y Llanos, R. M. 2003. Molecular and cellular aspects of copper transport in developing mammals. *J Nutr*, **133**:1481S-1484S.

- Merriam, E. V. y Bruns, P. J. 1988. Phenotypic assortment in *Tetrahymena thermophila*: assortment kinetics of antibiotic-resistance markers, tsA, death, and the highly amplified rDNA locus. *Genetics*, **120**:389-395.
- Miao, W., Xiong, J., Bowen, J., Wang, W., Liu, Y., Braguinets, O., Grigull, J., Pearlman, R. E., Orias, E. y Gorovsky, M. A. 2009. Microarray analyses of gene expression during the *Tetrahymena thermophila* life cycle. *PLoS ONE*, **4**:e4429.
- Miceli, C., La Terza, A., Bradshaw, R. A. y Luporini, P. 1992. Identification and structural characterization of a cDNA clone encoding a membrane-bound form of the polypeptide pheromone Er-1 in the ciliate protozoan *Euplotes raikovi*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**:1988-1992.
- Miles, A. T., Hawksworth, G. M., Beattie, J. H. y Rodilla, V. 2000. Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **35**:35-70.
- Moilanen, L. H., Fukushige, T. y Freedman, J. H. 1999. Regulation of metallothionein gene transcription. Identification of upstream regulatory elements and transcription factors responsible for cell-specific expression of the metallothionein genes from *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*, **274**:29655-29665.
- Molloy, P. L. 2000. Electrophoretic Mobility Shift Assay. En: *Methods in Molecular Biology*, vol. 148: DNA-Protein Interactions Principles and Protocols. Tymms, M. J. (ed.). Humana Press Inc, Totowa, NJ. **130**:235-246.
- Nassiri, Y., Ginsburger-Vogel, T., Mansot, J. L. y Wery, J. 1997a. Effects of heavy metals on *Etraselmis suecica*: ultrastructural and energy-disperse X-ray spectroscopic studies. *Biology of the Cell*, **86**:151-160.
- Nassiri, Y., Mansot, J. L., Wery, J., Ginsburger-Vogel, T. y Amiard, J. C. 1997b. Ultrastructural and electron energy loss spectroscopy studies of sequestration mechanisms of Cd and Cu in the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Archives in Environmental Contamination and Toxicology*, **33**:147-155.
- National Research Council (U.S.). Committee on Bioavailability of Contaminants in Soils and Sediment Inc. 2003. Bioavailability of contaminants in soils and sediments processes, tools, and applications. Washington, D.C., National Academy Press.
- Neuwald, A. F., Liu, J. S. y Lawrence, C. E. 1995. Gibbs motif sampling: detection of bacterial outer membrane protein repeats. *Protein Sci*, **4**:1618-1632.
- Newman, M. y Unger, M. A. 2003. Molecular Effects and Biomarkers. *Fundamentals of Ecotoxicology* CRC Press Boca Ratón. 118-120.
- Nies, D. H. 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol*, **51**:730-750.
- Nies, D. H. 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev*, **27**:313-339.

Bibliografía

- Nies, D. H. 2007. Bacterial transition metal homeostasis. En: Molecular microbiology of heavy metals. Nies, D. H. y Silver, S. (eds.). Springer-Verlag, Berlin. **6**:118-142.
- Nilsson, J. R. 1978. Retention of Lead Within the Digestive Vacuole in *Tetrahymena*. *Protoplasma*, **95**:163-173.
- Nilsson, J. R. 1989. *Tetrahymena* in cytotoxicology: with special reference to effects of heavy metals and selected drugs. *Eur J Protistol*, **25**:2-25.
- Nilsson, J. R. 1996. Effects of a bismuth salt on cell proliferation, endocytosis and fine structure of *Tetrahymena*. *Eur J Protistol*, **32**:283-292.
- Nilsson, J. R. 1997. *Tetrahymena* recovering from a heavy accumulation of gold salt. *Acta Protozoologica*, **36**:111-119.
- Notredame, C., Higgins, D. G. y Heringa, J. 2000. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol*, **302**:205-217.
- Nriagu, J. O. y Pacyna, J. M. 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, **333**:134-139.
- Nury, D., Chabanon, H., Levadoux-Martin, M. y Hesketh, J. 2005. An eleven nucleotide section of the 3'-untranslated region is required for perinuclear localization of rat metallothionein-1 mRNA. *Biochem J*, **387**:419-428.
- Ortiz, D. F., Kreppler, L., Speiser, D. M., Scheel, G., McDonald, G. y Ow, D. W. 1992. Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *EMBO J*:3491-3949.
- Páez-Espino, D., Tamames, J., de Lorenzo, V. y Canovas, D. 2009. Microbial responses to environmental arsenic. *Biomaterials*, **22**:117-130.
- Pagani, A., Villarreal, L., Capdevila, M. y Atrian, S. 2007. The *Saccharomyces cerevisiae* Crs5 Metallothionein metal-binding abilities and its role in the response to zinc overload. *Mol Microbiol*, **63**:256-269.
- Palmiter, R. D. 1998. The elusive function of metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**:8428-8430.
- Parente, A., Merrifield, B., Geraci, G. y D'Alessio, G. 1985. Molecular basis of superreactivity of cysteine residues 31 and 32 of seminal ribonuclease. *Biochemistry*, **24**:1098-1104.
- Park, J. N., Sohn, M. J., Oh, D. B., Kwon, O., Rhee, S. K., Hur, C. G., Lee, S. Y., Gellissen, G. y Kang, H. A. 2007. Identification of the cadmium-inducible *Hansenula polymorpha* SEO1 gene promoter by transcriptome analysis and its application to whole-cell heavy-metal detection systems. *Appl Environ Microbiol*, **73**:5990-6000.
- Pathy, L. 1999. Genome evolution and the evolution of exon-shuffling--a review. *Gene*, **238**:103-114.

- Penkowa, M. y Hidalgo, J. 2000. Metallothionein I+II expression and their role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia*, **32**:247-63.
- Pepi, M., Reniero, D., Baldi, F. y Barbieri, P. 2006. A Comparison of MER::LUX Whole Cell Biosensors And Moss, A Bioindicator, For Estimating Mercury Pollution. *Water Air Soil Pollut*, **173**:163-175.
- Pérez-Rama, M., Torres Vaamonde, E. y Abalde Alonso, J. 2005. Capillary zone electrophoresis for analysis of phytochelatin and other thiol peptides in complex biological samples derivatized with monobromobimane. *Electrophoresis*, **26**:610-620.
- Perriere, G. y Gouy, M. 1996. WWW-query: an on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie*, **78**:364-369.
- Petänen, T. y Romantschuk, M. 2002. Use of bioluminescent bacterial sensors as an alternative method for measuring heavy metals in soil extracts. *Anal Chim Acta*, **456**:55-61.
- Petänen, T., Virta, M., Karp, M. y Romantschuk, M. 2001. Construction and Use of Broad Host Range Mercury and Arsenite Sensor Plasmids in the Soil Bacterium *Pseudomonas fluorescens* OS8. *Microb Ecol*, **41**:360-368.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. y Dempfle, L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, **30**:e36.
- Piano, A., Valbonesi, P. y Fabbri, E. 2004. Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals. *Cell Stress Chaperones*, **9**:134-142.
- Piccinni, E. y Albergoni, V. 1996. Cadmium Detoxification in Protists. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **113C**:141-147.
- Piccinni, E., Bertaggia, D., Santovito, G., Miceli, C. y Kraev, A. 1999. Cadmium metallothionein gene of *Tetrahymena pyriformis*. *Gene*, **234**:51-59.
- Piccinni, E., Irato, P., Coppellotti, O. y Guidolin, L. 1987. Biochemical and ultrastructural data on *Tetrahymena pyriformis* treated with copper and cadmium. *J Cell Sci*, **88 (Pt 3)**:283-293.
- Piccinni, E., Staudenmann, W., Albergoni, V., De Gabrieli, R. y James, P. 1994. Purification and primary structure of metallothioneins induced by cadmium in the protists *Tetrahymena pigmentosa* and *Tetrahymena pyriformis*. *Eur J Biochem*, **226**:853-859.
- Poirot, O., O'Toole, E. y Notredame, C. 2003. Tcoffee@igs: A web server for computing, evaluating and combining multiple sequence alignments. *Nucleic Acids Res*, **31**:3503-3506.
- Pope, J.G., McConchiea, D.M., Clarka, M.D. y Brown, K.L. 2004. Diurnal variations in the chemistry of geothermal fluids after discharge, Champagne Pool, Waiotapu, New Zealand. *Chemical Geology*, **203**:253-272.

Bibliografia

- Preston, S., Coad, N., Townend, J., Killham, K. y Graeme, I. P. 2000. Biosensing the acute toxicity of metal interactions : Are they additive, synergistic, or antagonistic? *Env Tox Chem*, **19**:775-780.
- Promega 2006. Luciferase Assay System. Technical Bulletin. Madison, WI, USA.
- Pulido, P., Kägi, J. H. R. y Vallee, B. L. 1966. Isolation and Some Properties of Human Metallothionein*. *Biochemistry*, **5**:1768-1777.
- Pyne, C. K., Iftode, F. y Cury, J. 1983. The effects of cadmium on the growth pattern and ultrastructure of the ciliate *Tetrahymena pyriformis* *Biol. Cel.* **48**:121-132.
- Radtke, F., Heuchel, R., Georgiev, O., Hergersberg, M., Gariglio, M., Dembic, Z. y Schaffner, W. 1993. Cloned transcription factor MTF-1 activates the mouse metallothionein I promoter. *EMBO J*, **12**:1355-1362.
- Raikov, L. B. 1982. The protozoan nucleus. Morphology and evolution. Springer New York. p. 221-242.
- Rainbow, P. S., Amiard-Triquet, C., Amiard, J. C., Smith, B. D. y Langston, W. J. 2000. Observations on the interaction of zinc and cadmium uptake rates in crustaceans (amphipods and crabs) from coastal sites in UK and France differentially enriched with trace metals. *Aquat Toxicol*, **50**:189-204.
- Ramos, J., Clemente, M. R., Naya, L., Loscos, J., Pérez-Rontome, C., Sato, S., Tabata, S. y Becana, M. 2007. Phytochelatin synthases of the model legume *Lotus japonicus*. A small multigene family with differential response to cadmium and alternatively spliced variants. *Plant Physiol*, **143**:1110-1118.
- Ramos, J., Naya, L., Gay, M., Abian, J. y Becana, M. 2008. Functional characterization of an unusual phytochelatin synthase, LjPCS3, of *Lotus japonicus*. *Plant Physiol*, **148**:536-545.
- Rauser, W. E. 1990. Phytochelatin. *Annu Rev Biochem*, **59**:61-86.
- Rauser, W. E. 1995. Phytochelatin and related peptides: structure, biosynthesis and function. *Plant Physiol*:1141-1149.
- Rauser, W. E. 1999. Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin and metallothioneins. *Cell. Biochem. Biophys.*:19-48.
- Rea, P. A. 2006. Phytochelatin synthase, papain's cousin, in stereo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**:507-508.
- Rea, P. A., Vatamaniuk, O. K. y Rigden, D. J. 2004. Weeds, worms, and more. Papain's long-lost cousin, phytochelatin synthase. *Plant Physiol*, **136**:2463-2474.
- Reddy, S. P. y Mossman, B. T. 2002. Role and regulation of activator protein-1 in toxicant-induced responses of the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **283**:L1161-1178.

- Rensing, C., Ghosh, M. y Rosen, B. P. 1999. Families of soft-metal-ion-transporting ATPases. *J Bacteriol*, **181**:5891-5897.
- Rensing, C. y Maier, R. M. 2003. Issues underlying use of biosensors to measure metal bioavailability. *Ecotoxicol Environ Saf*, **56**:140-147.
- Rico, D., Martín-González, A., Díaz, S., de Lucas, P. y Gutiérrez, J. C. 2009. Heavy metals generate reactive oxygen species in terrestrial and aquatic ciliated protozoa. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **149**:90-96.
- Rico, D., Díaz, S., Hamilton, E. P., Martín-González, A., Gutiérrez, J. C. y Orias, E. (2003) The family of *Tetrahymena thermophila* cadmium-induced metallothioneins contain a third, closely related member. *FASEB Congress*. Bethesda, USA.
- Riek, R., Precheur, B., Wang, Y., Mackay, E. A., Wider, G., Guntert, P., Liu, A., Kagi, J. H. y Wuthrich, K. 1999. NMR structure of the sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) metallothionein MTA. *J Mol Biol*, **291**:417-428.
- Riether, K. B., Dollard, M. A. y Billard, P. 2001. Assessment of heavy metal bioavailability using *Escherichia coli* *zntAp::lux* and *copAp::lux*-based biosensors. *Appl Microbiol Biotechnol*, **57**:712-716.
- Roberto, F. F., Barnes, J. M. y Bruhn, D. F. 2002. Evaluation of a GFP reporter gene construct for environmental arsenic detection. *Talanta*, **58**:181-188.
- Robinson, N. J., Whitehall, S. K. y Cavet, J. S. 2001. Microbial metallothioneins. *Adv Microb Physiol*, **44**:183-213.
- Robinson, N. J., Tommey, A. M., Kuske, C. y Jackson, P. J. 1993. Plant metallothioneins. *Biochem J*, **295 (Pt 1)**:1-10.
- Rodríguez-Mozaz, S., López de Alda, M. J. y Barceló, D. 2006. Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring. *Anal Bioanal Chem*, **386**:1025-1041.
- Romanyuk, N. D., Rigden, D. J., Vatamaniuk, O. K., Lang, A., Cahoon, R. E., Jez, J. M. y Rea, P. A. 2006. Mutagenic definition of a papain-like catalytic triad, sufficiency of the N-terminal domain for single-site core catalytic enzyme acylation, and C-terminal domain for augmentative metal activation of a eukaryotic phytochelatin synthase. *Plant Physiol*, **141**:858-869.
- Ronquist, F. y Huelsenbeck, J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**:1572-1574.
- Rossi, M. R., Somji, S., Garrett, S. H., Sens, M. A., Nath, J. y Sens, D. A. 2002. Expression of *hsp 27*, *hsp 60*, *hsc 70*, and *hsp 70* stress response genes in cultured human urothelial cells (UROtsa) exposed to lethal and sublethal concentrations of sodium arsenite. *Environ Health Perspect*, **110**:1225-1232.

- Ruotolo, R., Peracchi, A., Bolchi, A., Infusini, G., Amoresano, A. y Ottonello, S. 2004. Domain organization of phytochelatin synthase: functional properties of truncated enzyme species identified by limited proteolysis. *J Biol Chem*, **279**:14686-14693.
- Saito, S., Okabe, M., Yoshida, K. y Kurasaki, M. 1999. The effect of heavy metal-induced metallothionein on Zn, Cu and Cd accumulation in rat. *Pharmacol Toxicol*, **84**:255-260.
- Sambrook, J. y Russell, D. W. 2001. Molecular cloning : a laboratory manual. Laboratory Press, Cold Spring Harbor [New York].
- Samson, S. L. y Gedamu, L. 1998. Molecular analyses of metallothionein gene regulation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **59**:257-288.
- Santovito, G., Formigari, A., Boldrin, F. y Piccinni, E. 2007. Molecular and functional evolution of *Tetrahymena metallothioneins*: new insights into the gene family of *Tetrahymena thermophila*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **144**:391-397.
- Santovito, G., Irato, P., Palermo, S., Boldrin, F., Sack, R., Hunziker, P. y Piccinni, E. L. 2001. Identification, cloning and characterisation of a novel copper-metallothionein in *Tetrahymena pigmentosa*. Sequencing of cDNA and expression. *Protist*, **152**:219-229.
- Scarano, G. y Morelli, E. 2002. Characterization of cadmium- and lead-phytochelatin complexes formed in a marine microalga in response to metal exposure. *Biometals*, **15**:145-151.
- Scott, D. L., Ramanathan, S., Shi, W., Rosen, B. P. y Daunert, S. 1997. Genetically engineered bacteria: electrochemical sensing systems for antimonite and arsenite. *Anal Chem*, **69**:16-20.
- Schagat, T. 2007. Normalizing genetic reporter assays: approaches and considerations for increasing consistency and statistical significance. *Cell Notes*:9-12.
- Schat, H., Llugany, M., Vooijs, R., Hartley-Whitaker, J. y Bleeker, P. M. 2002. The role of phytochelatin in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. *J Exp Bot*, **53**:2381-2392.
- Schmitt-Wrede, H. P., Koewius, H., Tschuschke, S., Greven, H. y Wunderlich, F. 2004. Genomic organization of the cadmium-inducible tandem repeat 25-kDa metallothionein of the oligochaete worm *Enchytraeus buchholzi*. *Biochim Biophys Acta*, **1680**:24-33.
- Schultz, D. W. y Yarus, M. 1994. Transfer RNA Mutation and the Malleability of the Genetic Code. *Journal of Molecular Biology*, **235**:1377-1380.
- Schultz, T. W. 1997. TETRATOX: *Tetrahymena pyriformis* population growth impairment endpoint- A surrogate for fish lethality. *Toxicol. Methods* **7**:289-309.
- Seebaugh, D. R., Goto, D. y Wallace, W. G. 2005. Bioenhancement of cadmium transfer along a multi-level food chain. *Mar Environ Res*, **59**:473-491.
- Semple, K. T., Doick, K. J., Jones, K. C., Burauel, P., Craven, A. y Harms, H. 2004. Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environ Sci Technol*, **38**:228A-231A.

- Shang, Y., Song, X., Bowen, J., Corstanje, R., Gao, Y., Gaertig, J. y Gorovsky, M. A. 2002. A robust inducible-repressible promoter greatly facilitates gene knockouts, conditional expression, and overexpression of homologous and heterologous genes in *Tetrahymena thermophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**:3734-3739.
- Shaulian, E. y Karin, M. 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*, **4**:E131-136.
- Shaw, G. y Kamen, R. 1986. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell*, **46**:659-667.
- Shen, C. H. y Clark, D. J. 2001. DNA sequence plays a major role in determining nucleosome positions in yeast *CUP1* chromatin. *J Biol Chem*, **276**:35209-35216.
- Shetty, R. S., Deo, S. K., Liu, Y. y Daunert, S. 2004. Fluorescence-based sensing system for copper using genetically engineered living yeast cells. *Biotechnol Bioeng*, **88**:664-70.
- Shetty, R. S., Deo, S. K., Shah, P., Sun, Y., Rosen, B. P. y Daunert, S. 2003. Luminescence-based whole-cell-sensing systems for cadmium and lead using genetically engineered bacteria. *Anal Bioanal Chem*, **376**:11-17.
- Shuja, R. N. y Shakoori, A. R. 2007. Identification, cloning and sequencing of a novel stress inducible metallothionein gene from locally isolated *Tetrahymena tropicalis lahorensis*. *Gene*, **405**:19-26.
- Shuja, R. N. y Shakoori, A. R. 2008. Identification and cloning of first cadmium metallothionein like gene from locally isolated ciliate, *Paramecium* sp. *Mol Biol Rep*, **36**:549-60.
- Silver, S. y Phung, L. T. 2005. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J Ind Microbiol Biotechnol*, **32**:587-605.
- Siu, F. K., Lee, L. T. y Chow, B. K. 2008. Southwestern blotting in investigating transcriptional regulation. *Nat Protoc*, **3**:51-58.
- Smirnova, I. V., Bittel, D. C., Ravindra, R., Jiang, H. y Andrews, G. K. 2000. Zinc and cadmium can promote rapid nuclear translocation of metal response element-binding transcription factor-1. *J Biol Chem*, **275**:9377-9384.
- Smith, J. J., Cole, E. S. y Romero, D. P. 2004. Transcriptional control of *RAD51* expression in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Nucleic Acids Res*, **32**:4313-4321.
- Smith, J. J., Torigoe, S. E., Maxson, J., Fish, L. C. y Wiley, E. A. 2008. A class II histone deacetylase acts on newly synthesized histones in *Tetrahymena*. *Eukaryot Cell*, **7**:471-482.
- Sorensen, S. J., Burmolle, M. y Hansen, L. H. 2006. Making bio-sense of toxicity: new developments in whole-cell biosensors. *Curr Opin Biotechnol*, **17**:11-6.
- Stephen, D. W., Rivers, S. L. y Jamieson, D. J. 1995. The role of the *YAP1* and *YAP2* genes in the regulation of the adaptive oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, **16**:415-423.

- Stocker, J., Balluch, D., Gsell, M., Harms, H., Feliciano, J., Daunert, S., Malik, K. A. y van der Meer, J. R. 2003. Development of a set of simple bacterial biosensors for quantitative and rapid measurements of arsenite and arsenate in potable water. *Environ Sci Technol*, **37**:4743-4750.
- Stohs, S. J. y Bagchi, D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med*, **18**:321-336.
- Stringham, E. G. y Candido, E. P. 1994. Transgenic hsp16-lacZ strains of the soil nematode *Caenorhabditis elegans* as biological monitors of environmental stress. *Environ Toxicol Chem*, **13**:1211-1220.
- Suntres, Z. E. 2002. Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology*, **180**:65-77.
- Swain, S. C., Keusekotten, K., Baumeister, R. y Sturzenbaum, S. R. 2004. *C. elegans* metallothioneins: new insights into the phenotypic effects of cadmium toxicosis. *J Mol Biol*, **341**:951-959.
- Syring, R. A., Hoexum Brouwer, T. y Brouwer, M. 2000. Cloning and sequencing of cDNAs encoding for a novel copper-specific metallothionein and two cadmium-inducible metallothioneins from the blue crab *Callinectes sapidus*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **125**:325-332.
- Tamai, K. T., Liu, X., Silar, P., Sosinowski, T. y Thiele, D. J. 1994. Heat shock transcription factor activates yeast metallothionein gene expression in response to heat and glucose starvation via distinct signalling pathways. *Mol Cell Biol*, **14**:8155-8165.
- Tanguy, A. y Moraga, D. 2001. Cloning and characterization of a gene coding for a novel metallothionein in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT2): a case of adaptive response to metal-induced stress? *Gene*, **273**:123-130.
- Tauriainen, S., Karp, M., Chang, W. y Virta, M. 1998. Luminescent bacterial sensor for cadmium and lead. *Biosens Bioelectron*, **13**:931-938.
- Tauriainen, S., Virta, M., Chang, W. y Karp, M. 1999. Measurement of firefly luciferase reporter gene activity from cells and lysates using *Escherichia coli* arsenite and mercury sensors. *Anal Biochem*, **272**:191-198.
- Tauriainen, S. M., Virta, M. P. J. y Karp, M. T. 2000. Detecting bioavailable toxic metals and metalloids from natural water samples using luminescent sensor bacteria, *Water Research*, **34**:2661-2666.
- Taylor, J. S. y Raes, J. 2004. Duplication and divergence: the evolution of new genes and old ideas. *Annu Rev Genet*, **38**:615-643.
- Tennstedt, P., Peisker, D., Bottcher, C., Trampczynska, A. y Clemens, S. 2008. Phytochelatin synthesis is essential for the detoxification of excess Zn and contributes significantly to the accumulation of Zn. *Plant Physiol*, **149**: 938-948.

- Thevenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A. y Wilson, G.S. 2001. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens Bioelectron*, **16**:121-131.
- Tibazarwa, C., Corbisier, P., Mench, M., Bossus, A., Solda, P., Mergeay, M., Wyns, L. y van der Lelie, D. 2001. A microbial biosensor to predict bioavailable nickel in soil and its transfer to plants. *Environ Pollut*, **113**:19-26.
- Tio, L., Villarreal, L., Atrian, S. y Capdevila, M. 2004. Functional differentiation in the mammalian metallothionein gene family: metal binding features of mouse MT4 and comparison with its paralog MT1. *J Biol Chem*, **279**:24403-24413.
- Tio, L., Villarreal, L., Atrian, S. y Capdevila, M. 2006. The Zn- and Cd-clusters of recombinant mammalian MT1 and MT4 metallothionein domains include sulfide ligands. *Exp Biol Med (Maywood)*, **231**:1522-1527.
- Tom-Petersen, A., Hosbond, C. y Nybroe, O. 2001. Identification of copper-induced genes in *Pseudomonas fluorescens* and use of a reporter strain to monitor bioavailable copper in soil. *FEMS Microbiol Ecol*, **38**:59.
- Tonnina, D., Campanella, L., Sammartino, M.P. y Visco, G. 2002. Integral toxicity test of sea waters by an algal biosensor. *Ann Chim*, **92**:477-484.
- Tourancheau, A. B., Tsao, N., Klobutcher, L. A., Pearlman, R. E. y Adoutte, A. 1995. Genetic code deviations in the ciliates: evidence for multiple and independent events. *EMBO J*, **14**:3262-3267.
- Trinchella, F., Riggio, M., Filosa, S., Parisi, E. y Scudiero, R. 2008. Molecular cloning and sequencing of metallothionein in squamates: new insights into the evolution of the metallothionein genes in vertebrates. *Gene*, **423**:48-56.
- Tsien, R. Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, **67**:509-544.
- Tsuji, N., Nishikori, S., Iwabe, O., Shiraki, K., Miyasaka, H., Takagi, M., Hirata, K. y Miyamoto, K. 2004. Characterization of phytochelatin synthase-like protein encoded by *alr0975* from a prokaryote, *Nostoc* sp. PCC 7120. *Biochem Biophys Res Commun*, **315**:751-755.
- Tsuji, N., Nishikori, S., Iwabe, O., Matsumoto, S., Shiraki, K., Miyasaka, H., Takagi, M., Miyamoto, K. y Hirata, K. 2005. Comparative analysis of the two-step reaction catalyzed by prokaryotic and eukaryotic phytochelatin synthase by an ion-pair liquid chromatography assay. *Planta*, **222**:181-191.
- Turkewitz, A.P., Orias, E. y Kapler, G. 2002. Functional genomics: the coming of age for *Tetrahymena thermophila*. *Trends Genet*, **18**:35-40.
- Valko, M., Morris, H. y Cronin, M. T. 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*, **12**:1161-1208.

- Valls, M., Bofill, R., González-Duarte, R., González-Duarte, P., Capdevila, M. y Atrian, S. 2001. A new insight into metallothionein (MT) classification and evolution. The *in vivo* and *in vitro* metal binding features of *Homarus americanus* recombinant MT. *J Biol Chem*, **276**:32835-32843.
- van der Meer, J. R., Tropel, D. y Jaspers, M. 2004. Illuminating the detection chain of bacterial bioreporters. *Environ Microbiol*, **6**:1005-1020.
- Vasak, M. y Hasler, D.W. 2000. Metallothioneins: new functional and structural insights. *Curr Opin Chem Biol*, **4**:177-183.
- Vatamaniuk, O.K., Bucher, E.A., Sundaram, M.V. y Rea, P.A. 2005. CeHMT-1, a putative phytochelatin transporter, is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*, **280**:3684-23690.
- Vatamaniuk, O. K., Mari, S., Lu, Y. P. y Rea, P. A. 1999. AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: isolation and *in vitro* reconstitution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**:7110-7115.
- Vatamaniuk, O. K., Mari, S., Lu, Y. P. y Rea, P. A. 2000. Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase. *J Biol Chem* **276**:31451-31459.
- Verma, N. y Singh, M. 2005. Biosensors for heavy metals. *Biometals*, **18**:121-129.
- Verstrepen, K. J., Jansen, A., Lewitter, F. y Fink, G. R. 2005. Intragenic tandem repeats generate functional variability. *Nat Genet*, **37**:986-990.
- Vestergaard, M., Matsumoto, S., Nishikori, S., Shiraki, K., Hirata, K. y Takagi, M. 2008. Chelation of Cadmium Ions by Phytochelatin Synthase: Role of the Cystein-rich C-Terminal. *Analytical Sciences* **24**:277-281.
- Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N. y Panfoli, I. 2000. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **46**:407-417.
- Viarengo, A., Palmero, S., Zanicchi, G., Capelli, R., Vaissiere, R. y Orunesu, M. 1985. Role of metallothioneins in Cu and Cd accumulation and elimination in the gill and digestive gland cells of *Mytilus galloprovincialis*. *Lam Mar Environ Rese*, **16**:23-26.
- Vidal, F. y Hidalgo, J. 1993. Effect of zinc and copper on preimplantation mouse embryo development *in vitro* and metallothionein levels. *Zygote*, **1**:225-229.
- Villarreal, L., Tio, L., Capdevila, M. y Atrian, S. 2006. Comparative metal binding and genomic analysis of the avian (chicken) and mammalian metallothionein. *FEBS J*, **273**:523-535.
- Virta, M., Lampinen, J. y Karp, M. 1995. A Luminescence-Based Mercury Biosensor. *Analytical Chemistry*, **67**:667-669.
- Visviki, I. y Rachlin, J.W. 1994. Acute and chronic exposure of *Dunaliella salina* and *Chlamydomonas bullosa* to copper and cadmium: effects on growth. *Arch Environ Contam Toxicol*, **26**:149-153.

- Vivares, D., Arnoux, P. y Pignol, D. 2005. A papain-like enzyme at work: native and acyl-enzyme intermediate structures in phytochelatin synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**:18848-18853.
- Walker, C. H., Hopkin, S. P., Sibly, R. M. y Peakall, D. B. 2006. Principles of ecotoxicology. CRC/Taylor & Francis, Boca Raton [etc.]. p. XXVI, 315 p.
- Walmsley, R. M. y Keenan, P. 2000. The eukaryote alternative: Advantages of using yeasts in place of bacteria in microbial biosensor development *Biotechnol Bioprocess Eng*, **5**:387-394.
- Wallace, A. y Wallace, G. A. 1994. A possible flaw in EPA's 1993 new sludge rule due to heavy metals interactions. *Commun Soil Sci Plant Anal*, **25**:129-135.
- Wang, H., Zhang, Q., Cai, B., Li, H., Sze, K. H., Huang, Z. X., Wu, H. M. y Sun, H. 2006. Solution structure and dynamics of human metallothionein-3 (MT-3). *FEBS Lett*, **580**:795-800.
- Westin, G. y Schaffner, W. 1988. A zinc-responsive factor interacts with a metal-regulated enhancer element (MRE) of the mouse metallothionein-I gene. *EMBO J*, **7**:3763-70.
- Whelan, S. y Goldman, N. 2001. A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Mol. Biol. Evol.*, **18**:691-699.
- Whitelaw, C. A., Le Huquet, J. A., Thurman, D. A. y Tomsett, A. B. 1997. The isolation and characterization of type II metallothionein-like genes from tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Plant Mol Biol*, **33**:503-511.
- Wicklund Glynn, A. 2001. The influence of zinc on apical uptake of cadmium in the gills and cadmium influx to the circulatory system in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **128**:165-172.
- Wilson, G. S. y Ammam, M. 2007. In vivo biosensors. *FEBS J*, **274**:5452-5461.
- Wilson, M. J., Coyne, C. y Glen, D. M. 1998. Low Temperatures Suppress Growth of the Ciliate Parasite, *Tetrahymena rostrata*, and Pathogenicity to Field Slugs, *Deroceras reticulatum*. *Biocontrol Science and Technology*, **8**:181-184.
- Williams, P. L., Ma, H., Glenn, T. C., Jagoe, C. H. y Jones, K. L. 2009. A Transgenic Strain of the Nematode *Caenorhabditis elegans* as a Biomonitor for Heavy Metal Contamination. *Environ Toxicol Chem*, **28**:1.
- Winge, D. R., Nielson, K. B., Gray, W. R. y Hamer, D. H. 1985. Yeast metallothionein. Sequence and metal-binding properties. *J Biol Chem*, **260**:14464-14470.
- Wu, A., Wemmie, J. A., Edgington, N. P., Goebel, M., Guevara, J. L. y Moye-Rowley, W. S. 1993. Yeast bZip proteins mediate pleiotropic drug and metal resistance. *J Biol Chem*, **268**:18850-18858.

Bibliografia

- Wunschmann, J., Beck, A., Meyer, L., Letzel, T., Grill, E. y Lenzian, K. J. 2007. Phytochelatins are synthesized by two vacuolar serine carboxypeptidases in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, **581**:1681-1687.
- Yamada, K., Kato, H., Kanda, N., Fujii-Kuriyama, Y., Utakoji, T. y Itoh, R. 1994. Sequence homology of Chinese hamster metallothionein genes I and II to those of the mouse and rat, and their amplification in Cd-resistant cells. *Biochim Biophys Acta*, **1219**:581-591.
- Yao, M. C. y Yao, C. H. 1981. Repeated hexanucleotide C-C-C-C-A-A is present near free ends of macronuclear DNA of *Tetrahymena*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**:7436-7439.
- Zaug, A. J. y Cech, T. R. 1986. The intervening sequence RNA of *Tetrahymena* is an enzyme. *Science*, **231**:470-475.
- Zenk, M. H. 1996. Heavy metal detoxification in higher plants - a review. *Gene*, **179**:21-30
- Zhang, B., Egli, D., Georgiev, O. y Schaffner, W. 2001. The *Drosophila* homolog of mammalian zinc finger factor MTF-1 activates transcription in response to heavy metals. *Mol Cell Biol*, **21**:4505-4514.
- Zhang, H., Xu, W., Guo, J., He, Z. y Ma, M. 2005. Coordinated responses of phytochelatins and metallothioneins to heavy metals in garlic seedlings *Plant. Sci.*, **169**:1059-1065.
- Zuker, M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*, **31**:3406-15.

Anexo 1. Tablas complementarias

Denominación en este trabajo	Gen/ Proteína	Especie	Número de Acceso
AtPCS1	<i>AtPCS1</i>	<i>Arabidopsis. thaliana</i>	AD41794 AF085230
AtPCS2	<i>AtPCS2</i>	<i>Arabidopsis. thaliana</i>	Q9ZWB7
ATU1	<i>ATU1</i>	<i>Tetrahymena thermophila</i>	AAA211350
AvPCS	<i>AvPCS</i>	<i>Anabaena variabilis</i>	ABA22569
BjPCS	<i>BjPCS</i>	<i>Brassica juncea</i>	CAC37692
BtauCREB1	<i>CREB1</i>	<i>Bos taurus</i>	P27925
BxPCS	<i>BxPCS</i>	<i>Burkholderia xenovorans</i>	ABE34681
CePCS	<i>CePCS</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	AAK62991 AAK62992
CeleFOS	<i>FOS1</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_00103348
CsapCUMT2	<i>MT2</i>	<i>Callinectes sapidus</i>	AAF08966
CvirMT4	<i>MT4</i>	<i>Crassostrea virginica</i>	CAK22381
DdPCS	<i>DdPCS</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>	DDB0219651
DmelCREB-A	<i>CREBA</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	AAA28427
EfetMT	<i>MT</i>	<i>Eisenia foetida</i>	ABC48927
GmPCS	<i>GmPCS</i>	<i>Glycine max</i>	AAL78384
HsapFOS	<i>FOS</i>	<i>Homo sapiens</i>	CAG47063
HsapMT1B	<i>MT-1B</i>	<i>Homo sapiens</i>	P07438
MmusJUN-B	<i>JUNB</i>	<i>Mus musculus</i>	NP_032442
NoceMT	<i>Mt</i>	<i>Nitrosococcus oceani</i>	YP_344861
NsPCS	<i>NsPCS</i>	<i>Nostoc sp.</i>	BAD10973.1
PentMT	<i>MT</i>	<i>Pseudomonas entomophila</i>	YP_608349
PtPCS	<i>PtPCS</i>	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP001447068
RnorATF3	<i>ATF3</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	NP_037044
SpPCS	<i>SpPCS</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	SPAC3H1 CAA92263
StPCS	<i>StPCS</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	CAD68110
TaPCS	<i>TaPCS</i>	<i>Triticum aestivum</i>	AAD50592
TpigMT-1	<i>MT-1</i>	<i>Tetrahymena pigmentosa</i>	EU420056
TpigMT-2	<i>MT-2</i>	<i>Tetrahymena pigmentosa</i>	AF479586
TpyrMT-1	<i>MT-1</i>	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	AJ005080
TpyrMT-2	<i>MT-2</i>	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	AY765220
TrosMTT1	MTT1	<i>Tetrahymena thermophila</i>	EU627174
TrosMTT2	MTT2	<i>Tetrahymena thermophila</i>	EU627175
TthebZIP1	<i>TthebZIP1</i>	<i>Tetrahymena thermophila</i>	CH670384.2
TthebZIP2	<i>TthebZIP2</i>	<i>Tetrahymena thermophila</i>	CH445546.1
TthebZIP3	<i>TthebZIP3</i>	<i>Tetrahymena thermophila</i>	CH670384.2
TthebZIP4	<i>TthebZIP4</i>	<i>Tetrahymena thermophila</i>	CH555555.2
TtheMTT1	<i>MTT1</i>	<i>Tetrahymena thermophila</i>	EU627174
TtheMTT2	<i>MTT2</i>	<i>Tetrahymena thermophila</i>	AY204351
TtheMTT3	MTT3	<i>Tetrahymena thermophila</i>	EF195744
TtheMTT4	<i>MTT4</i>	<i>Tetrahymena thermophila</i>	AY660008
TtheMTT5	MTT5	<i>Tetrahymena thermophila</i>	DQ517936
TtroMTT1	<i>MTT1</i>	<i>Tetrahymena tropicalis</i>	EF185997
TtΨPCS	TtΨPCS	<i>Tetrahymena thermophila</i>	DQ082725
YlipMT	<i>MT2</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	P41928
ZmMT2	<i>MT2</i>	<i>Zea mays</i>	P43401

Tabla A1. Número de acceso de la secuencia de los genes citados en este trabajo. En negrita se indican las secuencias introducidas en el banco de genes del NCBI derivadas de este trabajo de Tesis Doctoral u obtenidas por nuestro grupo de trabajo.

Tratamiento	<i>ThebMTT1</i> (SB1969)			<i>ThebMTT3</i> (SB1969)			<i>ThebMTT5</i> (SB1969)			<i>TiψPCS</i> (SB1969)			<i>TrosMTT1</i> (ID-3)			<i>TrosMTT2</i> (ID-3)		
	IND	SD	p-valor	IND	SD	p-valor	IND	SD	p-valor	IND	SD	p-valor	IND	SD	p-valor	IND	SD	p-valor
Cd 1h	10,1	3,3	<0,05	3,26	2	<0,05	49,38	9,5	<0,05	7,87	2,66	<0,001	1663,02	609,81	<0,01	20,07	0,88	20,07
Cu 1h	1	0	NS	1	0	NS	2,41	0,3	<0,05	0,86	0,07	NS	562,75	108,93	<0,01	117,3	10,32	117,3
Cd+Cu 1h	15,2	4,5	<0,05	5,65	2,3	<0,05	58,04	4,1	<0,05	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Zn 1h	9	2,2	<0,05	14,4	8,3	<0,05	32,1	5	<0,05	---	---	---	60,56	3,71	<0,01	5,41	0,3	5,41
Pb 1h	6,5	1,3	<0,05	3,1	1,7	<0,05	75,7	2,4	<0,05	2,04	0,07	NS	1036,94	55,65	<0,01	25,83	0,43	25,83
Ni 1h	1	0	NS	1,3	0	NS	1,2	0,2	NS	---	---	---	---	---	---	---	---	---
As 1h	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,99	0,21	NS	850,54	95,73	<0,01	5,53	0,13	5,53
Cd 24h	9,32	3,7	<0,05	6,79	4,46	NS	41,17	10,9	<0,05	1,23	0,19	NS	261,47	114,15	<0,01	4,53	0,74	4,53
Cu 24h	1,53	0,3	<0,05	1,44	0,3	NS	2,22	0,04	NS	0,81	0,09	NS	15,90	9,82	<0,01	7,69	3,06	7,69
Zn 24h	1	0,3	NS	1,62	1	NS	1	0	NS	---	---	---	17,42	8,98	<0,01	5,48	1,69	5,48
Pb 24h	4,3	0,4	<0,01	1	0	NS	121,8	21,6	<0,05	1,12	0,36	NS	566,03	57,79	<0,01	3,16	0,298	3,16
Ni 24h	1	0	NS	1,76	1,3	NS	1	0	NS	---	---	---	5,60	0	<0,01	2,09	0,64	2,09
As 24h	4,23	1,2	<0,01	1,9	0,5	NS	60,4	1,9	<0,05	1,61	0,58	NS	18,39	2,77	<0,01	0,61	0,16	0,61
4°C 2h	1	0	NS	1	0	NS	1	0	NS	---	---	---	0,33	0,02	NS	9,25	1,92	9,25
42°C 2h	1,33	0,33	NS	2,5	1,3	NS	1	0	NS	---	---	---	171,01	43,13	<0,01	132,76	80,47	132,76
pH 5 24h	2	0,1	<0,05	1,64	0	NS	78,3	38,7	<0,05	---	---	---	0,78	0,45	NS	0,82	0,49	0,82
pH 9 24h	1	0	NS	1	0	NS	6,13	0,6	<0,05	---	---	---	0,79	0,08	NS	1,21	0,1	1,21
PQ 24h	1	0	NS	1,47	0,2	NS	6,63	1,5	<0,05	---	---	---	1,46	0,43	NS	4,63	1M43	4,63
Inanición 24h	1	0	NS	1	0	NS	3,32	0,17	<0,05	---	---	---	110,58	19,38	<0,01	26,92	18,64	26,92
Inanición 96h	1	0	NS	1	0	NS	1	0	NS	---	---	---	31,69	13,45	<0,01	1,27	0,6	1,27
Tratamiento	<i>ThebZIP1</i> (SB1969)			<i>ThebZIP2</i> (SB1969)			<i>ThebZIP3</i> (SB1969)			<i>gfp</i> (SB1969)			<i>ThebMTT5</i> (SB1969)					
	IND	SD	p-valor	IND	SD	p-valor	IND	SD	p-valor	IND	SD	p-valor	IND	SD	p-valor	IND	SD	p-valor
Cd 1h	6,75	2,09	<0,05	2,76	0,53	<0,05	2,72	1,84	NS	---	Cd A	2h	---	---	---	207,44	100,43	<0,05
Cd 24h	5,02	0,16	<0,05	3,80	0,35	<0,05	5,85	1,60	<0,05	---	Cd B	2h	---	---	---	0	0	---
Tratamiento	<i>lucFF</i> (MTT1Luc)			<i>lucFF</i> (MTT1Luc)			<i>gfp</i> (GFPMTT5)			<i>ThebMTT5</i> (GFPMTT5)								
	IND	SD	p-valor	IND	SD	p-valor	IND	SD	p-valor	IND	SD	p-valor	IND	SD	p-valor	IND	SD	p-valor
Cd 2h	18,30	12,11	<0,05	282,37	54,22	<0,05	---	---	---	---	Cd A	2h	3558,9	755	<0,05	646,37	94,2	<0,05
Cu 2h	1,09	0,21	NS	1,86	0,86	<0,05	---	---	---	---	Cd B	2h	5990	613,7	<0,05	1986	227,41	<0,05
Zn 2h	0,83	0,28	NS	0,54	0,37	NS	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Pb 2h	5,92	3,26	<0,05	105,11	3,41	<0,05	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Tabla A2. Niveles de inducción relativa de los genes de *T. thermophila* (*Theb*) y *T. rostrata* (*Tros*) analizados en este trabajo, tras la exposición del ciliado a distintas condiciones de estrés. IND: Nivel de inducción de la expresión relativa respecto al control. SD: Desviación estándar. Se indica también el nivel de significación (p-valor; p<0,05; p<0,01) tras realizar el análisis estadístico. NS: no significativo. Entre paréntesis se indica la cepa de *T. thermophila* o *T. rostrata* en la que se analizó la expresión de cada gen.

muestra (mg/kg)	1g muestra (mg)	milliQ(1/10) (mg/L)	(M)
--------------------	--------------------	------------------------	-----

Muestra 11			
Cd	4.53×10^{-2}	4.53×10^{-5}	4.53×10^{-3}
Cr	7.17	7.17×10^{-3}	7.17×10^{-1}
Cu	5.67	5.67×10^{-3}	5.67×10^{-1}
Ni	3.44	3.44×10^{-3}	3.44×10^{-1}
Pb	7.26	7.26×10^{-3}	7.26×10^{-1}
Zn	2.11×10	2.11×10^{-2}	2.11
Hg	5.66×10	5.66×10^{-2}	5.66

Muestra 12			
Cd	3.69×10^{-2}	3.69×10^{-5}	3.69×10^{-3}
Cr	7.15	7.15×10^{-3}	7.15×10^{-1}
Cu	5.98	5.98×10^{-3}	5.98×10^{-1}
Ni	4.73	4.73×10^{-3}	4.73×10^{-1}
Pb	7.05	7.05×10^{-3}	7.05×10^{-1}
Zn	2.11×10	2.11×10^{-2}	2.11
Hg	4.95×10	4.95×10^{-2}	4.95

Muestra 13			
Cd	4.26×10^{-6}	4.26×10^{-5}	4.26×10^{-1}
Cr	7.61	7.61×10^{-3}	7.61×10^{-1}
Cu	6.57	6.57×10^{-3}	6.57×10^{-1}
Ni	5.59	5.59×10^{-3}	5.59×10^{-1}
Pb	1.01×10	1.01×10^{-2}	1.01
Zn	2.67×10	2.67×10^{-2}	2.67
Hg	4.93×10	4.93×10^{-2}	4.93

muestra (mg/kg)	1g muestra (mg)	milliQ(1/10) (mg/L)	(M)
--------------------	--------------------	------------------------	-----

Muestra 14			
Cd	0.37	3.70×10^{-4}	3.70×10^{-2}
Cr	27.12	2.71×10^{-2}	2.71
Cu	205.3	2.05×10^{-1}	2.05×10^1
Ni	147.2	1.47×10^{-1}	1.47×10^1
Pb	29.03	2.90×10^{-2}	2.90×10^1
Zn	429.7	4.29×10^{-1}	4.29×10^1
Hg	0.77353	7.74×10^{-4}	7.74×10^{-2}

Muestra 15			
Cd	0.034	3.40×10^{-5}	3.40×10^{-3}
Cr	6.48	6.48×10^{-3}	6.48×10^{-1}
Cu	3.43	3.43×10^{-3}	3.43×10^{-1}
Ni	5.25	5.25×10^{-3}	5.25×10^{-1}
Pb	5.21	5.21×10^{-3}	5.21×10^{-1}
Zn	22.42	2.24×10^{-2}	2.24
Hg	49.52	4.95×10^{-2}	4.95

Muestra 16			
Cd	¿?	¿?	¿?
Cr	¿?	¿?	¿?
Cu	¿?	¿?	¿?
Ni	¿?	¿?	¿?
Pb	1.26×10^1	1.26×10^{-2}	1.26
Zn	¿?	¿?	¿?
Hg	¿?	¿?	¿?

muestra (mg/kg)	1g muestra (mg)	milliQ(1/10) (mg/L)	(M)
--------------------	--------------------	------------------------	-----

Muestra 17			
Cd	3.05×10^{-3}	3.05×10^{-6}	3.05×10^{-4}
Cr	¿?	¿?	¿?
Cu	¿?	¿?	¿?
Ni	¿?	¿?	¿?
Pb	¿?	¿?	¿?
Zn	¿?	¿?	¿?
Hg	¿?	¿?	¿?

Muestra 18			
Cd	5.21×10^{-3}	5.21×10^{-6}	5.21×10^{-4}
Cr	¿?	¿?	¿?
Cu	¿?	¿?	¿?
Ni	¿?	¿?	¿?
Pb	¿?	¿?	¿?
Zn	¿?	¿?	¿?
Hg	¿?	¿?	¿?

Tabla A3. Contenido total de metales de las muestras de suelo (11-18) utilizadas en los experimentos del apartado C.2.3.2 determinadas por métodos físico-químicos. Se indica también la concentración de metal teórica de cada una de las soluciones de trabajo preparadas a partir de 1g de tierra de cada muestra en 10 ml de H₂O Milli Q. M: concentración molar

Anexo 2. Artículos publicados

A continuación se incluyen las referencias de y enlace web de los artículos científicos en los que han sido publicados gran parte de los resultados del presente trabajo de Tesis Doctoral. El factor de impacto de cada revista científica se indica en la siguiente Tabla A4.

1. Gutiérrez, J. C., Amaro, F. y Martín-González, A. 2009. From heavy metal-binders to biosensors: ciliate metallothioneins discussed. *Bioessays* 31(7): 805-16 (doi:10.1002/bies.200900011)

<http://www3.interscience.wiley.com/journal/122421504/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>

2. Amaro, F., Ruotolo R., Martín-González, A., Faccini, A., Ottonello, S. y Gutiérrez, J.C. 2009. A pseudo-phytochelatase synthase in the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila*. *Comp. Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 149(4): 598-604 (doi:10.1016/j.cbpc.2009.01.002)

http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6W89-4VBMNGT-1&_user=10&_coverDate=05%2F31%2F2009&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&_view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=3fd5056ba95fd14dccc485553e2b3098

3. Amaro F, de Lucas M. P., Martín-González A. y Gutiérrez J. C. 2008. Two new members of the *Tetrahymena* multi-stress-inducible metallothionein family: characterization and expression analysis of *T. rostrata* Cd/Cu metallothionein genes. *Gene.* 423(1): 85-91 (doi: 10.1016/j.gene.2008.07.002)

http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T39-4SYTC7S-2&_user=10&_coverDate=10%2F15%2F2008&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&_view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=e9faea0949651fc3ab1c736c13c567d0

4. Díaz S., Amaro F., Rico D., Campos V., Benítez L., Martín-González A., Hamilton E., Orias E. y Gutiérrez JC. 2007. *Tetrahymena* Metallothioneins fall into two discrete subfamilies. *PLoS ONE* 2(3):e291. doi:10.371/journal.pone.0000291.

<http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0000291>

Revista	Factor de impacto (ISI) JRC (2008)
PLoS ONE	Aún sin factor de impacto oficial
Gene	2,871
Comparative Biochemistry and Physiology, Part C	2,530
BioEssays	5,316

Tabla A4. Factor de impacto según el *Institute for Scientific Information* (ISI) en 2008.

Anexo 3. Patentes

La Oficina Española de Patentes y Marcas (Ministerio de Industria, Turismo y Comercio) ha admitido a trámite las siguientes solicitudes de patentes:

Nº de solicitud: P200901622 para la construcción reportera pMTT1LucFF (base de la obtención del biosensor MTT1Luc)

Nº de solicitud: P200901621 para la construcción reportera pMTT5LucFF (base de la obtención del biosensor MTT5Luc)

